### (19)Евразийское патентное ведомство

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки 2022.12.19
- (22) Дата подачи заявки 2021.03.17

(51) Int. Cl. A61K 35/17 (2015.01) **A61K 39/395** (2006.01) **A61K 47/64** (2017.01)

- КОМБИНИРОВАННЫЙ ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР, НАЦЕЛЕННЫЙ НА CD19 И CD20, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ
- (31) 202010188038.1; 16/877,069; PCT/ CN2020/109645; 63/154,032
- (32) 2020.03.17; 2020.05.18; 2020.08.17; 2021.02.26
- (33)CN; US; CN; US
- (86) PCT/US2021/022779
- (87)WO 2021/188681 2021.09.23
- (71)Заявитель: СЕЛЛЮЛАР БИОМЕДИСИН ГРУП ГК ЛИМИТЕД (CN)
- **(72)** Изобретатель: Яо Ихун, Хуан Цзяци, Яо Синь, Чжу Шигуй, Ли Яньфэн, Вэй Юйтянь (CN)
- (74) Представитель: Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)
- В настоящем изобретении предложен комбинированный химерный антигенный рецептор, (57) нацеленный на CD19 и CD20, и его применение. В частности, в настоящем изобретении предложен комбинированный химерный антигенный рецептор, нацеленный на CD19 и CD20, который содержит scFv, нацеленный на CD19, и scFv, нацеленный на CD20, шарнирную область, трансмембранную область и внутриклеточный сигнальный домен. В настоящем изобретении предложены молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор и соответствующий экспрессирующийся вектор, САR-Т-клетка и их применения. Экспериментальные результаты демонстрируют то, что химерный антигенный рецептор, предложенный в настоящем изобретении, демонстрирует чрезвычайно высокую уничтожающую способность против опухолевых клеток. Химерный антигенный рецептор в соответствии с настоящим изобретением нацелен на CD19 и/или CD20 положительных клеток и может быть использован для лечения CD19 и/или CD20 положительной В-клеточной лимфомы, лейкоза и других заболеваний.

| TN-20LEU-19              | SP | Leu 16(VL-VH) | пинхр  | FMC63(VH-VL) | шариир | CD28<br>TM | 4-1BB | CD3z |
|--------------------------|----|---------------|--------|--------------|--------|------------|-------|------|
| TN-200F-19<br>(C-CAR039) | SP | OF (VL-VH)    | пенхер | FMC63(VH-VL) | mapoup | CD28       | 4-1BB | CD3z |

PCT/US2021/022779

МПК: **А61К 35/17** (2015.01) **А61К 47/64** (2017.01) **А61К 39/395** (2006.01)

# КОМБИНИРОВАННЫЙ ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР, НАЦЕЛЕННЫЙ НА CD19 И CD20, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

#### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области биомедицины и, конкретнее, к комбинированному химерному антигенному рецептору, нацеленному на CD19 и CD20, и его применениям.

#### Предшествующий уровень техники

Злокачественные опухоли кровеносной системы составляют приблизительно 10% от злокачественных опухолей у людей, и 95% злокачественных опухолей кровеносной системы происходят из В-лимфоцитов. Традиционная химиотерапия и лучевая терапия играют важную роль при лечении злокачественных опухолей кровеносной системы. У некоторых пациентов имеются значительные эффекты, но большинство пациентов трудно вылечить. Новые и эффективные способы лечения являются актуальной темой в этой области.

Адаптивная Т-клеточная терапия продемонстрировала свою мощную эффективность и яркую перспективу в клиническом лечении злокачественных опухолей. В настоящее время ее рассматривают как один из наиболее перспективных способов лечения гематологических опухолей. СD19 высоко экспрессируется на поверхности большинства злокачественных В-клеточных новообразований. Множество центров, независимо использующих Т-клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором (САR), нацеленные на рецидивирующих трудно поддающихся лечению злокачественных опухолей экспрессирующих CD19 B-клеток, добились беспрецедентного успеха. В настоящее время оба продукта CAR-T, одобренные FDA (Управление по надзору в сфере пищевых продуктов и лекарственных средств), нацелены против антигена CD19, и их показания также расширяются, например хронический лимфоцитарный лейкоз. Хотя эффективность CAR-Т против CD19 является выдающейся, множество исследований показали, что также существует множество проблем с Т-клеточной терапией с химерным антигенным рецептором (CAR) против CD19. Существуют некоторые пациенты с плохими результатами лечения и легким рецидивированием. Причины последнего включают склонность опухолевых клеток к антигенному ускользанию. Например,

недавний эксперимент с CAR-клеточной терапией против CD19 продемонстрировал то, что 90% пациентов достигали полной ремиссии, но у 11% этих пациентов в конечном итоге возникал рецидив, и рецидивирующие пациенты были в основном пациентами, страдающими от СD19-негативной опухоли. В частности, в клиническом исследовании, проведенном на медицинском факультете Пенсильванского университета (the University of Pennsylvania School of Medicine) с использованием CART19 при лечении рецидивирующей трудно поддающейся лечению острой Вклеточной лимфомы (R/R B-ALL), до 94% пациентов достигали полной ремиссии. Несмотря на то, что исходная частота ответа в этом клиническом исследовании была высокой, почти 40% пациентов демонстрировали рецидив через 1 месяц лечения, который достигал полной ремиссии, и более чем 60% рецидивирующих пациентов демонстрировали ускользание СD19-негативных опухолевых клеток. Антигенное ускользание обнаружено при адаптивном переносе специфичных Т-клеточных рецепторов, экспрессирующих NY-ESO1, и при лечении меланомы противораковыми вакцинами. Спонтанная мутация и селективная экспансия являются основными причинами антигенного ускользания.

Таким образом, существует острая необходимость в разработке способов эффективного лечения опухоли и предупреждения антигенного ускользания.

#### Краткое изложение сущности изобретения

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить способ эффективного лечения опухоли и предупреждения антигенного ускользания.

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить комбинированный химерный антигенный рецептор, нацеленный на CD19 и CD20, и способ его получения.

В частности, задача настоящего изобретения заключается именно в том, чтобы предложить последовательность комбинированного химерного антигенного рецептора, нацеленного на CD19 и CD20, а также способ получения и идентификации активности модифицированных им Т-клеток (CART-19/20). В настоящем изобретении предложена структура химерного антигенного рецептора для применения в лечении CD19 и CD20-позитивной В-клеточной лимфомы.

В описании настоящего изобретения предложен биспецифичный химерный антигенный рецептор (CAR). Биспецифичный CAR может содержать: (1) антигенсвязывающую область против CD20, которая содержит вариабельную область

легкой цепи (V<sub>L</sub>1) и вариабельную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>1), имеющие аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 3, соответственно; и (2) антигенсвязывающую область против CD19, которая содержит вариабельную область легкой цепи (V<sub>L</sub>2) и вариабельную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>2), имеющую аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно.

B некоторых воплощениях  $V_L1$  расположен по N-концу  $V_H1$ . B некоторых воплощениях  $V_{H2}$  расположен по N-концу  $V_{L2}$ .

Антигенсвязывающая область против CD20 может представлять собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с CD20. Антигенсвязывающая область против CD19 может представлять собой scFv, который специфически связывается с CD19. В некоторых воплощениях, scFv, который специфически связывается с CD20, расположен по N-концу scFv, который специфически связывается с CD19.

Биспецифичный CAR может дополнительно содержать: (а) лидерную последовательность, (б) шарнирную область, (в) трансмембранный домен, (г) по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область, (д) цитоплазматический сигнальный домен или (е) их комбинацию.

Костимулирующая сигнальная область может быть получена из 4-1BB (CD137), CD28, OX40, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD70, CD134, PD1, Dap10, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), NKG2D, GITR, TLR2 или их комбинаций.

Цитоплазматический сигнальный домен может быть получен из CD3ζ.

Шарнирная область может быть получена из Ig4, CD8, CD28, CD137 или их комбинаций.

Трансмембранный домен может быть получен из CD8, CD28, CD36, CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 или их комбинаций.

В некоторых воплощениях биспецифичный CAR может иметь аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 16.

В описании настоящего изобретения предложена иммунная клетка, экспрессирующая биспецифичный CAR по настоящему изобретению. Иммунная клетка может представлять собой Т-клетку или клетку-натуральный киллер (NK).

Иммунная клетка может быть аллогенной или аутологической.

Также охвачена в описании настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифичный CAR по настоящему изобретению.

В описании настоящего изобретения дополнительно предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению.

В описании настоящего изобретения предложен способ лечения рака. Этот способ может включать введение иммунной клетки субъекту, нуждающемуся в этом.

Рак может представлять собой гематологический рак. Рак может представлять собой В-клеточное злокачественное новообразование. Рак может представлять собой лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лейкоз и/или множественную миелому. Рак может представлять собой острый миелолейкоз (AML), множественную миелому (MM), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому (DLBCL) или их комбинации.

В первом аспекте изобретения предложен химерный антигенный рецептор (CAR), где структура химерного антигенного рецептора представлена в формуле I, как показано ниже:

L-scFv1-I-scFv2-H-TM-C-CD3ζ (I),

гле

каждый "-" независимо представляет собой пептидный линкер или пептидную связь;

L представляет собой необязательную последовательность сигнального пептида:

І представляет собой гибкий линкер;

Н представляет собой необязательную шарнирную область;

ТМ представляет собой трансмембранный домен;

С представляет собой костимулирующую сигнальную молекулу;

 ${\rm CD}3\zeta$  представляет собой цитоплазматическую сигнальную последовательность, полученную из  ${\rm CD}3\zeta$ ;

один из scFv1 и scFv2 представляет собой антигенсвязывающий домен антитела, нацеленный на CD19, а другой представляет собой антигенсвязывающий домен антитела, нацеленный на CD20.

В еще одном предпочтительном воплощении scFv1 представляет собой

антигенсвязывающий домен антитела, нацеленный на CD20, и scFv2 представляет собой антигенсвязывающий домен антитела, нацеленный на CD19.

В еще одном предпочтительном воплощении структура антигенсвязывающего домена антитела, нацеленного на CD20, представлена в формуле A или B, как показано ниже:

где V<sub>H1</sub> представляет собой вариабельную область тяжелой цепи антитела против CD20; V<sub>L1</sub> представляет собой вариабельную область легкой цепи антитела против CD20; и "-" представляет собой пептидный линкер или пептидную связь.

В еще одном предпочтительном воплощении структура антигенсвязывающего домена антитела, нацеленного на CD20, представлена в формуле В.

В еще одном предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность  $V_{H1}$  представлена в SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность  $V_{L1}$  представлена в SEQ ID NO: 2; или

аминокислотная последовательность  $V_{H1}$  представлена в SEQ ID NO: 3, и аминокислотная последовательность  $V_{L1}$  представлена в SEQ ID NO: 4.

В еще одном предпочтительном воплощении  $V_{H1}$  и  $V_{L1}$  связаны гибким линкером (или пептидным линкером), и гибкий линкер (или пептидный линкер) представляет собой 1-4, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 3-4 следующие друг за другом последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 7 (GGGGS).

B еще одном предпочтительном воплощении  $V_{L1}$  и  $V_{H1}$  связаны гибким линкером, приведенные в SEQ ID NO: 19.

В еще одном предпочтительном воплощении структура антигенсвязывающего домена антитела, нацеленного на CD19, представлена в формуле С или D, как показано ниже:

$$V_{L2}$$
- $V_{H2}$  (C);  $V_{H2}$ - $V_{L2}$  (D)

где  $V_{L2}$  представляет собой вариабельную область легкой цепи антитела против CD19;  $V_{H2}$  представляет собой вариабельную область тяжелой цепи антитела против CD19; и "-" представляет собой пептидный линкер или пептидную связь.

В еще одном предпочтительном воплощении структура антигенсвязывающего домена антитела, нацеленного на CD19, представлена в формуле D.

B еще одном предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность  $V_{L2}$  представлена в SEQ ID NO: 5, и аминокислотная

последовательность V<sub>H2</sub> представлена в SEQ ID NO: 6.

В еще одном предпочтительном воплощении  $V_{H2}$  и  $V_{L2}$  связаны гибким линкером (или пептидным линкером), и гибкий линкер (или пептидный линкер) представляет собой 1-4, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 3-4 следующие друг за другом последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 7 (GGGGS).

B еще одном предпочтительном воплощении  $V_{H2}$  и  $V_{L1}$  связаны гибким линкером, приведенные в SEQ ID NO: 20.

В еще одном предпочтительном воплощении scFv1 и/или scFv2 получены от мыши, представляют собой гуманизированные, гуманизированные и полученные от мыши химерные или полностью гуманизированные фрагменты вариабельной области одноцепочечного антитела.

В еще одном предпочтительном воплощении структура химерного антигенного рецептора представлена в формуле II, как показано ниже:

$$L-V_{L1}-V_{H1}-I-V_{H2}-V_{L2}-H-TM-C-CD3\zeta$$
 (II),

где каждый элемент является таким, как описано выше.

В еще одном предпочтительном воплощении последовательность гибкого линкера I содержит 2-6, предпочтительно 3-4 следующие друг за другом последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 7 (GGGGS).

В еще одном предпочтительном воплощении последовательность гибкого линкера I является такой, приведенные в SEQ ID NO: 7.

В еще одном предпочтительном воплощении L представляет собой сигнальный пептид белка, выбранного из группы, состоящей из CD8, CD28, GM-CSF, CD4, CD137 и их комбинации.

В еще одном предпочтительном воплощении L представляет собой сигнальный пептид, полученный из CD8.

В еще одном предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность L представлена в SEQ ID NO: 8.

В еще одном предпочтительном воплощении Н представляет собой шарнирную область белка, выбранного из группы, состоящей из CD8, CD28, CD137, Ig4 и их комбинации.

В еще одном предпочтительном воплощении H представляет собой шарнирную область, полученную из Ig4.

В еще одном предпочтительном воплощении аминокислотная

последовательность Н представлена в SEQ ID NO: 9.

В еще одном предпочтительном воплощении ТМ представляет собой трансмембранную область белка, выбранного из группы, состоящей из CD28, CD3є, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 и их комбинации.

В еще одном предпочтительном воплощении ТМ представляет собой трансмембранную область, полученную из CD8 или CD28.

В еще одном предпочтительном воплощении последовательность ТМ представлена в SEQ ID NO: 10 или 11.

В еще одном предпочтительном воплощении С представляет собой костимулирующую сигнальную молекулу белка, выбранного из группы, состоящей из ОХ40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD134, 4-1BB (CD137), PD1, Dap10, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), NKG2D, GITR, TLR2 и их комбинации.

В еще одном предпочтительном воплощении С представляет собой костимулирующую сигнальную молекулу, полученную из 4-1ВВ или CD28.

В еще одном предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность С представлена в SEQ ID NO: 12 или 13.

В еще одном предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность CD3ζ представлена в SEQ ID NO: 14.

В еще одном предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность CAR представлена в SEQ ID NO: 15 или 16.

В некоторых воплощениях, антигенсвязывающая область против CD20 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по

меньшей мере или приблизительно на 89%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 1.

В некоторых воплощениях, антигенсвязывающая область против СD20 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 75%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 82%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 87%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 89%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 92%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 94%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях, антигенсвязывающая область против CD19 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей

мере или приблизительно на 99%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 82%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно

В некоторых воплощениях, антигенсвязывающая область против CD19 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 75%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 82%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 87%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 89%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 92%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 94%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 5.

Вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела

против CD20 может содержать одну, две или три области, определяющие комплементарность (CDR), которые по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 75%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 82%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 87%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 89%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 92%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 94%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела офатумумаба (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 30-35, положениях 50-66, положениях 99-111 SEQ ID NO: 3, соответственно), или CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела Leu16 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 31-35, положениях 50-66, положениях 99-111 SEQ ID NO: 1, соответственно).

Вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 может содержать одну, две или три области, определяющие комплементарность (CDR), которые по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по

меньшей мере или приблизительно на 89%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 100% идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела офатумумаба (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 24-34, положениях 50-56, положениях 89-97 SEQ ID NO: 4, соответственно), или CDR вариабельной области легкой цепи антитела Leu16 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 24-33, положениях 49-55, положениях 88-96 SEQ ID NO: 2, соответственно).

Вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 может содержать одну, две или три области, определяющие комплементарность (CDR), которые по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 75%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 82%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 87%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 89%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 92%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 94%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, или приблизительно на 100%, идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела офатумумаба (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, соответственно), или CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела Leu16 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, соответственно).

Вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 может содержать одну, две или три области, определяющие комплементарность (CDR), которые по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 75%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 82%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 87%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 89%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 92%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 94%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела офатумумаба (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, соответственно), или CDR вариабельной области легкой цепи антитела Leu16 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, соответственно).

В некоторых воплощениях вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела офатумумаба (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 30-35, позиции 50-66, позиции 99-111 SEQ ID NO: 3), и вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела офатумумаба (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 24-34, положениях 50-56, положениях 89-97 SEQ ID NO: 4, соответственно).

В некоторых воплощениях вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 включает три CDR, которые

идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела офатумумаба (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, соответственно), и вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела офатумумаба (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, соответственно).

В некоторых воплощениях вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела Leu16 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 31-35, позиции 50-66, позиции 99-111 SEQ ID NO: 1, соответственно), и вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела Leu16 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 24-33, положениях 49-55, положениях 88-96 SEQ ID NO: 2, соответственно).

В некоторых воплощениях вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела Leu16 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, соответственно), и вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD20 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела Leu16 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, соответственно).

Вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD19 может содержать одну, две или три области, определяющие комплементарность (CDR), которые по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или прибл

мере или приблизительно на 87%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 100% идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела FMC63 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 31-35, положениях 50-65, положениях 98-109 SEQ ID NO: 6, соответственно).

Вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD19 может содержать одну, две или три области, определяющие комплементарность (CDR), которые по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 75%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 82%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 87%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 89%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 92%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 94%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела FMC63 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 24-34, положениях 50-56, положениях 89-97 SEQ ID NO: 5, соответственно).

Вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела

против CD19 может содержать одну, две или три области, определяющие комплементарность (CDR), которые по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 75%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 82%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 87%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 89%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 92%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или приблизительно на 94%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 99%, или приблизительно на 100% идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела FMC63 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, соответственно).

Вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD19 может содержать одну, две или три области, определяющие комплементарность (CDR), которые по меньшей мере или приблизительно на 70%, по меньшей мере или приблизительно на 80%, по меньшей мере или приблизительно на 85%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 81%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 83%, по меньшей мере или приблизительно на 84%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 86%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 88%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 90%, по меньшей мере или приблизительно на 91%, по меньшей мере или приблизительно на 93%, по меньшей мере или прибли

мере или приблизительно на 94%, по меньшей мере или приблизительно на 95%, по меньшей мере или приблизительно на 96%, по меньшей мере или приблизительно на 97%, по меньшей мере или приблизительно на 98%, по меньшей мере или приблизительно на 100% идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела FMC63 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 39, соответственно).

В некоторых воплощениях, вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD19 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела FMC63 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 31-35, положениях 50-65, положениях 98-109 SEQ ID NO: 6, соответственно), и вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD19 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела FMC63 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в положениях 24-34, положениях 50-56, положениях 89-97 SEQ ID NO: 5, соответственно).

В некоторых воплощениях вариабельная область тяжелой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD19 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области тяжелой цепи антитела FMC63 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, соответственно), и вариабельная область легкой цепи антигенсвязывающей области антитела против CD19 включает три CDR, которые идентичны CDR вариабельной области легкой цепи антитела FMC63 (CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 39, соответственно).

Во втором аспекте изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор в соответствии с первым аспектом изобретения.

В еще одном предпочтительном воплощении молекула нуклеиновой кислоты является выделенной.

В еще одном предпочтительном воплощении нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты представлена в SEQ ID NO: 17 или 18.

В третьем аспекте изобретения предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения.

В еще одном предпочтительном воплощении вектор содержит ДНК и РНК.

В еще одном предпочтительном воплощении вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, вирусного вектора, транспозона и их комбинации.

В еще одном предпочтительном воплощении вектор содержит ДНК-содержащий вирус и ретровирусный вектор.

В еще одном предпочтительном воплощении вектор выбран из группы, состоящей из лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора и их комбинации.

В еще одном предпочтительном воплощении вектор представляет собой лентивирусный вектор.

В четвертом аспекте изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая вектор в соответствии с третьим аспектом изобретения, или имеющая экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения, интегрированную в ее геном, или экспрессирующая химерный антигенный рецептор в соответствии с первым аспектом изобретения.

В еще одном предпочтительном воплощении клетка представляет собой выделенную клетку.

В еще одном предпочтительном воплощении клетка представляет собой генетически сконструированную клетку.

В еще одном предпочтительном воплощении клетка представляет собой клетку млекопитающего.

В еще одном предпочтительном воплощении клетка представляет собой CAR-Т-клетку и/или клетку CAR-NK.

В еще одном предпочтительном воплощении клетка нацелена как на CD19, так и на CD20.

В пятом аспекте изобретения предложен способ получения CAR-Т-клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор в соответствии с первым аспектом изобретения, где способ включает стадии: трансдукции молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения или вектора в соответствии с третьим аспектом изобретения в Т-клетку, с получением посредством этого CAR-Т-клетки.

В еще одном предпочтительном воплощении способ дополнительно включает стадию определения функции и эффективности полученной CAR-T-клетки.

В шестом аспекте изобретения предложен препарат, содержащий химерный антигенный рецептор в соответствии с первым аспектом изобретения, молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения, вектор в соответствии с третьим аспектом изобретения или клетку-хозяин в соответствии с четвертым аспектом изобретения и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

В еще одном предпочтительном воплощении препарат представляет собой жидкий препарат.

В еще одном предпочтительном воплощении композиция препарата предназначена для инъекции.

В еще одном предпочтительном воплощении препарат содержит клетку-хозяин в соответствии с четвертым аспектом изобретения, и концентрация клеток-хозяев составляет  $1\times10^3$ - $1\times10^8$  клеток/мл, предпочтительно,  $1\times10^4$ - $1\times10^7$  клеток/мл.

В седьмом аспекте изобретения предложено применение химерного антигенного рецептора в соответствии с первым аспектом изобретения, молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения, вектора в соответствии с третьим аспектом изобретения или клетки-хозяина в соответствии с четвертым аспектом изобретения для приготовления лекарственного препарата или композиции для предупреждения и/или лечения опухоли или рака.

В еще одном предпочтительном воплощении опухоль выбрана из группы, состоящей из гематологической опухоли, солидной опухоли и их комбинации; предпочтительно, опухоль представляет собой гематологическую опухоль.

В еще одном предпочтительном воплощении опухоль крови выбрана из группы, состоящей из острого миелолейкоза (AML), множественной миеломы (MM), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (DLBCL) и их комбинации.

В еще одном предпочтительном воплощении солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака желудка, перитонеальных метастазов рака желудка, рака печени, лейкоза, почечного рака, рака легкого, рака тонкой кишки, рака кости, рака предстательной железы, колоректального рака, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака яичников, лимфомы, носоглоточной карциномы, адреналовой опухоли, опухоли мочевого пузыря, немелкоклеточного рака легкого

(NSCLC), глиомы, рака эндометрия и их комбинации.

В восьмом аспекте изобретения предложен набор для приготовления клетки в соответствии с четвертым аспектом изобретения, где набор содержит контейнер, и молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения или вектор в соответствии с третьим аспектом изобретения, расположенные в контейнере.

В девятом аспекте изобретения предложено применение клетки в соответствии с четвертым аспектом изобретения или композиции в соответствии с шестым аспектом изобретения для предупреждения и/или лечения рака или опухоли.

В десятом аспекте изобретения предложен способ лечения заболевания, включающий введение подходящего количества клетки в соответствии с четвертым аспектом изобретения или композиции в соответствии с шестым аспектом изобретения субъекту, нуждающемуся в лечении.

В еще одном предпочтительном воплощении заболевание представляет собой рак или опухоль.

В описании настоящего изобретения предложен биспецифичный химерный антигенный рецептор (CAR). Биспецифичный CAR может содержать: (1) антигенсвязывающую область против CD20, которая содержит вариабельную область легкой цепи (V<sub>L</sub>1) и вариабельную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>1), и (2) антигенсвязывающую область против CD19, которая содержит вариабельную область легкой цепи (V<sub>L</sub>2) и вариабельную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>2). V<sub>L</sub>1 может содержать три области, определяющие комплементарность (CDR) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100%, от приблизительно 85% до приблизительно 100%, от приблизительно 90% до приблизительно 100% или от приблизительно 95% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, изложенным в SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, соответственно. V<sub>H</sub>1 может содержать три CDR, CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100%, от приблизительно 85% до приблизительно 100%, от приблизительно 90% до приблизительно 100% или от приблизительно 95% до приблизительно 100%, идентичны аминокислотным последовательностям, изложенным в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, соответственно. V<sub>L</sub>2 может содержать три области, определяющие комплементарность (CDR), CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие

аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100%, от приблизительно 85% до приблизительно 100%, от приблизительно 90% до приблизительно 100% или от приблизительно 95% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, изложенным в SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 39, соответственно. Vн2 может содержать три CDR, CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100%, от приблизительно 90% до приблизительно 100% или от приблизительно 95% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, изложенным в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, соответственно.

В некоторых воплощениях  $V_L1$  расположен по N-концу  $V_{H1}$ .

В некоторых воплощениях V<sub>H</sub>2 расположен по N-концу V<sub>L</sub>2.

В некоторых воплощениях  $V_{L}1$  и  $V_{H}1$  имеют аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, изложенным в SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 3, соответственно.

В некоторых воплощениях  $V_L2$  и  $V_{H2}$  имеют аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, изложенным в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающая область против CD20 представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с CD20. В некоторых воплощениях антигенсвязывающая область против CD19 представляет собой scFv, который специфически связывается с CD19.

Биспецифичный CAR может дополнительно содержать одно или более чем одно из следующего: (а) сигнальный пептид, (б) шарнирную область, (в) трансмембранный домен, (г) костимулирующую область и (д) цитоплазматический сигнальный домен.

Костимулирующая область может содержать костимулирующую область 4-1BB (CD137), CD28, OX40, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD70, CD134, PD1, Dap10, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), NKG2D, GITR, TLR2 или их комбинации.

Цитоплазматический сигнальный домен может содержать цитоплазматический сигнальный домен  ${
m CD3}\zeta$ .

Шарнирная область может содержать шарнирную область Ig4, CD8, CD28, CD137 или их комбинации дикого типа или мутантов.

Трансмембранный домен может содержать трансмембранный домен CD8, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 или их комбинации.

В некоторых воплощениях биспецифичный САR содержит аминокислотную последовательность, которая на от приблизительно 80% до приблизительно 100%, от приблизительно 85% до приблизительно 100%, от приблизительно 90% до приблизительно 100%, или от приблизительно 95% до приблизительно 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO. 16.

В описании настоящего изобретения предложена иммунная клетка, экспрессирующая биспецифичный CAR по настоящему изобретению. Иммунная клетка может представлять собой Т-клетку или клетку-натуральный киллер (NK).

Также настоящим изобретением охвачена нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифичный CAR по настоящему изобретению.

В описании настоящего изобретения предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению.

В описании настоящего изобретения также предложен способ лечения рака. Этот способ может включать введение иммунной клетки по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

Иммунная клетка может быть аллогенной или аутологической.

Рак может представлять собой гематологический рак. Рак может представлять собой В-клеточное злокачественное новообразование. Рак может представлять собой лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лейкоз и/или множественную миелому. Рак может представлять собой острый миелолейкоз (AML), множественную миелому (MM), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому (DLBCL) или их комбинации.

В некоторых воплощениях биспецифичный CAR может генерировать площадь под кривой (AUC) в диапазоне от приблизительно 0,5e+06 копий/мкг геномной ДНК

(копий/гДНК) до приблизительно 4e+06 копий/гДНК, от приблизительно 0,5e+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,5е+06 копий/гДНК, от приблизительно 1е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,5е+06 копий/гДНК, от приблизительно 1,2е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,2е+06 копий/гДНК, от приблизительно 0,8е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,2е+06 копий/гДНК, от приблизительно 1,6е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,2е+06 копий/гДНК, от приблизительно 1е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 2e+06 копий/гДНК, от приблизительно 0,6e+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 1,8е+06 копий/гДНК, от приблизительно 3е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,2е+06 копий/гДНК, от приблизительно 0,5е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 1,7е+06 копий/гДНК, от приблизительно 2е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,2е+06 копий/гДНК, от приблизительно 1,5е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 2е+06 копий/гДНК, или от приблизительно 1е+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,2е+06 копий/гДНК в крови субъекта приблизительно через 28 суток после введения указанному субъекту биспецифичного CAR.

В некоторых воплощениях биспецифичный САR генерирует максимальную концентрацию в плазме крови (С<sub>плах</sub>) в диапазоне от приблизительно 0,8е+05 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,5е+05 копий/гДНК, от приблизительно 1е+05 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,5е+05 копий/гДНК, от приблизительно 1е+05 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 1е+05 копий/кдНК, от приблизительно 1е+05 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,3е+05 копий/гДНК, от приблизительно 0,8е+05 копий/гДНК, от приблизительно 0,8е+05 копий/гДНК, от приблизительно 0,8е+05 копий/гДНК, от приблизительно 1е+05 копий/гДНК) до приблизительно 2е+05 копий/гДНК, от приблизительно 1е+05 копий/кдНК, от приблизительно 2е+05 копий/кдНК, от приблизительно 3е+05 копий/гДНК, от приблизительно 3е+05 копий/гДНК, от приблизительно 3,5е+05 копий/гДНК, от приблизительно 2е+05 копий/кдНК) до приблизительно 2е+05 копий/кдНК, от приблизительно 2е+05 копий/кдНК) до приблизительно 2е+05 копий/кдНК, от приблизительно 2е+05 копий/кдНК) до приблизительно 2е+05 копий/кдНК, от приблизительно 2е+05 копий/кдНК

геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 2,5e+05 копий/гДНК, или от приблизительно 1e+05 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3e+05 копий/гДНК в крови субъекта после введения указанному субъекту биспецифичного CAR.

В некоторых воплощениях биспецифичный САR имеет  $T_{max}$  (время, которое требуется для того, чтобы биспецифичный САR достиг  $C_{max}$ ) в диапазоне от приблизительно 3 суток до приблизительно 20 суток, от приблизительно 4 суток до приблизительно 18 суток, от приблизительно 5 суток до приблизительно 17 суток, от приблизительно 6 суток до приблизительно 16 суток, от приблизительно 7 суток до приблизительно 15 суток, от приблизительно 15 суток, от приблизительно 10 суток до приблизительно 10 суток до приблизительно 10 суток до приблизительно 12 суток, от приблизительно 6 суток до приблизительно 14 суток, от приблизительно 12 суток до приблизительно 14 суток, от приблизительно 11 суток до приблизительно 14 суток, от приблизительно 11 суток, от приблизительно 8 суток до приблизительно 11 суток, от приблизительно 8 суток до приблизительно 10 суток до приблизительно 14 суток.

Понятно, что различные упомянутые выше технические признаки настоящего изобретения и различные технические признаки, в частности описанные далее (такие, как описанные в примерах), могут быть комбинированы друг с другом в объеме настоящего изобретения для того, чтобы составить новое или предпочтительное техническое решение, которое не обязательно должно быть описано одно за другим вследствие ограничений по объему.

#### Описание графических материалов

На фиг. 1 показана структура комбинированного химерного антигенного рецептора, нацеленного на CD19 и CD20. Структура CAR содержит последовательность сигнального пептида ("SP"), последовательность, распознающую антиген, шарнирную область, трансмембранную область, сигнальную область костимулирующего фактора и сигнальную область CD3ζ.

На фиг. 2A и 2B показан уровень экспрессии CD137 на поверхности Тклеточной мембраны (фиг. 2A) и уровень секреции IFN $\gamma$  в культуральном супернатанте (фиг. 2B). Конкретно,  $1\times10^5$  клеток CAR-T19/20s, культивируемых в течение 7 суток, отбирали и соответственно культивировали с CD19-позитивной линией опухолевых клеток K562-CD19+, CD20-позитивной линией опухолевых клеток K562-CD20+, дважды CD19 и CD20-позитивной линией опухолевых клеток K562-CD19+CD20+, линией опухолевых клеток RAJI, которая естественным образом экспрессирует CD19 и CD20, и дважды CD19 и CD20-негативной линией опухолевых клеток K562, или без опухолевых клеток, в 200 мкл среды GT-551 в течение 18 ч в соотношении 1:1. Затем соответственно определяли уровень экспрессии CD137 на поверхности Т-клеточной мембраны и уровень секреции IFN в культуральном супернатанте.

На фиг. 3А показано определение уничтожающей опухоль активности клеток CAR-T19/20s, основном, путем определения уровня секреции LDH (лактатдегидрогеназы) в супернатанте после совместного культивирования. Конкретно,  $1 \times 10^4$  клеток CD19-позитивной линии опухолевых клеток K562-CD19+, CD20-позитивной линии опухолевых клеток K562-CD20+, дважды CD19 и CD20позитивной линии опухолевых клеток K562-CD19+ CD20+, линии опухолевых клеток RAJI или RAMOS, которые естественным образом экспрессируют CD19 и CD20, или дважды CD19 и CD20-негативной линии опухолевых клеток K562, культивировали вместе с соответствующими Т-клетками, соответственно, в 100 мкл среды GT-551 в течение 8 ч в соотношении, представленным на данной фигуре. Затем определяли уровень секреции LDH, и на этой фигуре представлены результаты статистического анализа процентной доли высвобождения LDH в соответствующих образцах совместной культуры.

На фиг. 3В показано определение уничтожающей опухоль активности клеток CAR-T19/20s, в основном, путем обнаружения уровня экспрессии CD107a на поверхности Т-клеточной мембраны. В частности, 1×10<sup>5</sup> клеток CAR-T19/20s отбирали и культивировали, соответственно, с CD19-позитивной линией опухолевых клеток K562-CD19+, CD20-позитивной линией опухолевых клеток K562-CD20+, дважды CD19 и CD20-позитивной линией опухолевых клеток K562-CD19+CD20+, линией опухолевых клеток RAJI или RAMOS, которая в природе экспрессирует CD19 и CD20, и дважды CD19 и CD20-негативной линией опухолевых клеток K562, или без опухолевых клеток, в 200 мкл среды GT-551 в течение 4 ч в соотношении 1:2. Затем соответственно определяли уровень экспрессии CD137 на поверхности Т-клеточной мембраны.

На фиг. 4A показано изменение средней массы тела и изменение средней интенсивности флуоресценции у мышей, которым инъецировали клетки CAR-T19/20s

в течение 21 суток, где изменения регистрировали каждые 7 суток.

На фиг. 4B показана средняя интенсивность флуоресценции у трех групп мышей.

На фиг. 4C показана визуализация *in vivo* у мышей, которым инъецировали клетки CAR-T19/20s на 0 (D0), 7 (D7), 14 (D14) и 21 (D21) сутки после инъекции.

На фиг. 5A показано, что биспецифичные TN-OF-19 CAR-T-клетки могут подавлять или уничтожать *in vivo* опухолевые клетки лучше, чем CD19 специфические CAR-T-клетки.

На фиг. 5В показана визуализация при помощи IVIS интенсивности флуоресценции в группе 4 CAR-Т-клеток и группе NT.

На фиг. 6A показана структура CD20scFv-CD19scFv rabFc.

На фиг. 6В показано химерное антитело, связывающееся с клетками с CD19 или CD20 или с обоими, но не с клетками, лишенными обоих антигенов, что свидетельствует о том, что для биспецифичного связывающего домена требуется только один распознанный антиген для связывания и не образовывались никакие новые сайты специфического распознавания.

На фиг. 7 показаны структуры шестнадцати специфичных в отношении CD20 CAR с шестью различными scFV и различными шарнирными/TM/сигнальными доменами.

На фиг. 8A показаны результаты анализа высвобождения IFN для скрининга CAR-T20,1, CAR-T20,5, CAR-T20,6, CAR-T20,7, CAR-T20,8, CAR-T20,9 и CAR-T20,10, и среди этих CAR-T только CAR-T20,9 (Leu16) и CAR-T20,10 (Leu16) демонстрировали более высокое положительное высвобождение IFN у.

На фиг. 8В показаны результаты анализа высвобождения IFNγ для скрининга CAR-T20,1, CAR-T20,9, CAR-T20,10, CAR-T20,11, CAR-T20,12, CAR-T20,13, CAR-T20,14, CAR-T20,15 и CAR-T20,16. Среди этих CAR-T CAR-T20,10 (Leu16) и CAR-T20,14 (OF) демонстрировали более высокое положительное высвобождение IFNγ.

На фиг. 8С показаны результаты анализа высвобождения IFN $\gamma$  для скрининга CAR-T20,9, CAR-T20,12, CAR-T20,14, CAR-T20,17, CAR-T20,18 и CAR-T20,19. Среди этих CAR-Ts CAR-T20,14 (OF) и CAR-T20,19 (OF) демонстрировали более высокое положительное высвобождение IFN $\gamma$ .

На фиг. 9A показаны результаты тестирования клеток CAR-T20,17 (Leu16  $3^e$  поколение), CAR-T20,18 (Leu16  $2^e$  поколение), CAR-T20,19 (OF  $2^e$  поколение),

протестированных в отношении цитотоксичности при помощи анализа высвобождения LDH.

На фиг. 9В показано ингибирование *in vivo* опухолевого роста в исследованиях на мышах NSG. Опухолевые клетки, вводимые животным, представляют собой Raji, экспрессирующие люциферазу.

На фиг. 10 показана структура и блок-схема фазы I клинического исследования CAR039.

На фиг. 11 показано обобщение клинических результатов C-CAR039.

На фиг. 12 показаны примеры пациента до и после лечения C-CAR039.

На фиг. 13 показана пролиферация и рост C-CAR039, а также истощение В-клеток в периферической крови пациента. Эти результаты продемонстрировали то, что клетки C-CAR008 эффективно разрастались после введения. Квадрат: 1х10<sup>6</sup> CAR-Т-клеток/кг. Треугольник: 2~2,5х10<sup>6</sup> CAR-Т-клеток/кг. Окружность: 4~5,0х10<sup>6</sup> CAR-Т-клеток/кг. Сплошные символы (квадрат, треугольник, окружность): копии ДНК CAR-Т. Незакрашенные символы (квадрат, треугольник, окружность): уровень CD19/CD20+ В-клеток.

На фиг. 14 показана структура исследования C-CAR066-NHL.

На фиг. 15 показан пример PET-CT (позитронно-эмиссионной компьютерной томографии) для пациента до и после лечения C-CAR066.

Фиг 16A-16D: Идентификация оптимального антигенсвязывающего домена для биспецифичного CAR против CD19/CD20. На фиг. 16A показаны структуры TN-OF-19 (C-CAR039) и TN-19-OF. На фиг. 16B показано, что C-CAR039 с тандемной связью офатумумаб scFv с последующим FMC63 scFv демонстрирует превосходную противоопухолевую активность. На фиг. 16C показаны структуры TN-OF-19 (C-CAR039), TN-OFR-19, TN-OF-19R и TN-OFR-19R. На фиг. 16D показана превосходная противоопухолевая активность и специфическое связывание с оптимальной структурой антигенсвязывающего домена C-CAR039.

На фиг. 17A показан процесс оценки связывающей специфичности антигенсвязывающего домена C-CAR039. На фиг. 17B показано, что CD19, CD20 и FCGR1A идентифицировали с умеренным связыванием с концентрациями 5,0 мкг/мл. Никакие другие значимые взаимодействия не были идентифицированы. Сообщалось о том, что FCGR1 связываются с rabFc.

На фиг. 18 показана оценка Каплана-Мейера выживаемости без

прогрессирования (PFS) для C-CAR039.

На фиг. 19 показан профиль фармакокинетики (PK)/фармакодинамики (PD) для C-CAR039. Низкая доза ("Low"):  $1x10^6$  CAR-T-клеток/кг массы тела; Средняя доза ("Mid"):  $2x10^6 - 2,5x10^6$  CAR-T-клеток/кг массы тела; Высокая доза ("High"):  $4x10^6 - 5,0x10^6$  CAR-T-клеток/кг массы тела.

На фиг. 20 показан профиль PK/PD (разрастание CAR-T и истощение В-клеток) в периферической крови рецидивирующих пациентов.

#### Подробное описание изобретения

обширных и интенсивных исследований авторы изобретения неожиданно получили CAR-T-клетку, которая одновременно нацелена против CD19 и CD20. Более конкретно, в настоящем изобретении предложен химерный антигенный рецептор, который одновременно нацелен против CD19 и CD20, который содержит сигнальный пептид, scFv против CD20, scFv против CD19, шарнирную область, трансмембранную область и внутриклеточную Т-клеточную сигнальную область. Кроме того, scFv против CD20 и scFv против CD19, которые получали при помощи большого количества отборов, были связаны с пептидным фрагментом при помощи множества повторяющихся структур (G4S). САR-Т-клетки по настоящему изобретению могут одновременно распознавать как антигены CD19, так и антигены CD20, что снижает риск антигенного ускользания, вызванного понижающей регуляцией или устранением экспрессии антигена при обработке CAR-T-клетками, нацеленными на одну мишень. По сравнению с CAR-Т-клетками, нацеленными на один антиген и другими CAR-Т-клетками, нацеленными на две мишени (нацеленными на CD19 и CD20), CAR-T-клетки по настоящему изобретению, которые одновременно распознают две мишени, обладают более сильной уничтожающей способностью в отношении опухолевых клеток, меньшей цитотоксичностью, пониженным уровнем побочных эффектов, более широким диапазоном лечения, меньшим уровнем рецидивов и большей эффективностью. Настоящее изобретение было выполнено на основании этого.

#### <u>Термины</u>

Для того, чтобы сделать описание более понятным, сначала будут определены некоторые термины. Если здесь ясно не утверждается иное, то каждый из следующих терминов, используемых в данной заявке на изобретение, должен иметь значения, приведенные ниже. Другие определения изложены в тексте заявки на изобретение.

Термин "приблизительно" может относиться к величине или композиции в пределах приемлемого диапазона погрешностей для конкретной величины или композиции, определенного специалистом в данной области техники, который частично будет зависеть от того, каким образом измеряют или определяют данную величину или композицию.

Термин "введение" относится к физическому введению субъекту продукта по изобретению с использованием любого из множества способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники, включая внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутрибрюшинное, спинальное или другое парентеральное введение, такое как введение посредством инъекции или инфузии.

Термин "антитело" (Ab) может включать без ограничения иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном и содержит, по меньшей мере, две тяжелые (Н) цепи и две легкие (L) цепи, связанные дисульфидными связями, или их антигенсвязывающие фрагменты. Каждая цепь Н содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную здесь как Vн) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три константных домена СН1, СН2 и СН3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначенную здесь как V<sub>L</sub>) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит константный домен C<sub>L</sub>. Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно подразделены на гипервариабельные области, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с более консервативными участками, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL содержит три CDR и четыре FR, которые расположены от аминоконца к карбокси-концу в следующей последовательности: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

#### <u>CD20</u>

Несмотря на то, что эффективность CAR-T против CD19 является выдающейся, множество исследований показали, что есть все еще много проблем с Т-клеточной терапией с химерным антигенным рецептором (CAR) против CD19. Существуют некоторые пациенты с плохими результатами лечения и легко подверженные рецидивированию. Последнее включает восприимчивость опухолевых клеток к антигенному ускользанию.

Для того, чтобы избежать ускользания антигена CD19 от CAR-T, авторы изобретения разработали комбинированный биспецифичный CAR (т.е. BICAR), который нацелен против как CD19, так и CD20, так, что когда антиген CD19 ускользает и не экспрессируется в опухолевых клетках, CD20 может распознаваться для устранения опухолевых клеток *in vivo*.

СD20 экспрессируется у большинства пациентов с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом, включая некоторых пациентов, отрицательных по CD19 после лечения CAR-T против CD19. CD20 является гликозилированным белком, и является первым идентифицированным В-клеточным мембранным маркером. CD20 также известен как B1, и кодируется геном MS4A. У молекулы CD20 есть четыре трансмембранные гидрофобные области, и ее N-конец и C-конец расположены на цитоплазматической стороне, формируя два замкнутые петли вне клетки, называемые большой петлей и маленькой петлей, соответственно. CD20 специфически экспрессируется в больше чем 95% нормальных и злокачественных В-клетках. Эти клетки находятся на пре В-клеточной стадии и последующих стадиях развития, и CD20 останавливает экспрессию до тех пор, пока клетки не дифференцируются в плазматические клетки. В настоящем изобретении используют CD20 в качестве дополнительной мишени для иммунотерапии злокачественных новообразований В-клеток.

#### Биспецифичный химерный антигенный рецептор, нацеленный на CD19 и CD20

Клеточная иммунотерапия представляет собой новую и высокоэффективную модель лечения опухоли, и представляет собой новый тип аутоиммунологического лечения рака. Она представляет собой способ, при котором производят культивирование *in vitro* и амплификацию иммунных клеток, собранных у пациента с помощью биотехнологии и биологических агентов, и затем клетки переносят обратно пациенту для стимуляции и усиления аутоиммунной функции организма, тем самым достигая цели лечения опухоли. Специалисты в данной области работают над разработкой новой клеточной иммунотерапии для увеличения эффективности и снижения побочных действий.

В настоящем изобретении предложена рациональная и оптимизированная одноцепочечная конструкция и система, то есть комбинированный биспецифичный САR, который может быть эффективно интегрирован в основные человеческие Т-клетки, и может одновременно быть нацелен против CD19 и CD20, когда Т-клетки

активируются. CAR-Т-клетки по изобретению способны распознавать два антигена (CD19 и CD20). В данном изобретении предложен весьма эффективный потенциальный способ предотвращения антигенного ускользания.

В настоящем изобретении используется CAR, который одновременно нацелен против CD19 и CD20. По сравнению с CAR, которые нацелены против единичного антигена, аффинность усиливается, активность Т-клеток увеличивается, и мишени обладают аддитивным или синергетическим действием. Кроме того, из-за неравномерности уровней экспрессии CD19 и CD20 в опухолевых клетках терапия CAR-T против двойной мишени имеет более широкий охват. CAR-T, который одновременно нацелен против CD19 и CD20 на поверхности опухолевых клеток, может уменьшить возможность антигенного ускользания, вызванного понижающей регуляцией или удалением единственного поверхностного антигена.

Биспецифичность подразумевает то, что один и тот же CAR может специфично связываться и иммунизировать два различных антигена, и этот CAR может вызывать иммунный ответ путем связывания с любым из антигенов.

Биспецифичный в отношении CD19 и CD20 CAR по настоящему изобретению обладает единичной структурой и содержит scFv против CD19 и scFv против CD20. При этом, указанный CAR содержит scFv против CD19 и scFv против CD20, и аминокислотные последовательности, последовательность и шарнирная область scFv против CD19 и scFv против CD20 представляют собой основные факторы, оказывающие влияние на его функцию.

Более конкретно, химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Внеклеточный домен содержит специфичный в отношении мишени связывающий элемент (также известный как антигенсвязывающий домен). Внутриклеточный домен содержит костимулирующую сигнальную область и  $\zeta$  цепь. Костимулирующая сигнальная область относится к части внутриклеточного домена, которая содержит костимулирующую молекулу. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, необходимую для эффективного ответа лимфоцитов на антигены, а не антигенный рецептор или его лиганд.

Линкер может быть включен между внеклеточной областью и трансмембранным доменом CAR, или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом CAR. Используемый здесь термин "линкер" как правило

относится к любому олигопептиду или полипептиду, который играет роль связывания трансмембранного домена с внеклеточным доменом или цитоплазматическим доменом в полипептидной цепи. Линкер может содержать 0-300 аминокислот, предпочтительно 2-100 аминокислот и, наиболее предпочтительно 3-50 аминокислот.

В предпочтительном воплощении изобретения внеклеточный домен CAR, предложенного в настоящем изобретении, содержит антигенсвязывающий домен, нацеленный на CD19 и CD20. Когда CAR по настоящему изобретению экспрессируется в Т-клетке, тогда распознавание антигена может быть осуществлено на основе специфичности связывания с антигеном. Когда CAR связывается с соответствующим антигеном, он оказывает влияние на опухолевую клетку, что приводит к тому, что опухолевая клетка перестает расти, погибает или подвергается иному воздействию, что приводит к уменьшению или исчезновению опухолевого бремени у пациента. Антигенсвязывающий домен предпочтительно слит с внутриклеточным доменом из одной или более чем одной костимулирующей молекулы и  $\zeta$  цепи. Предпочтительно, антигенсвязывающий домен слит с внутриклеточным доменом из комбинации 4-1BB сигнального домена и CD3 $\zeta$  сигнального домена.

Используемый здесь "антигенсвязывающий домен" и "одноцепочечный фрагмент антитела" относится к фрагменту Fab, фрагменту Fab, фрагменту F(ab')2 или единичному фрагменту Fv, который обладает антигенсвязывающей аффинностью. Антитело Fv содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела, но не имеет константной области. Антитело Fv обладает наименьшим фрагментом антитела со всеми антигенсвязывающими сайтами. Как правило, антитела Fv также содержат полипептидный линкер между доменами Vн и VL, и могут образовывать структуру, требующуюся для связывания антигена. Антигенсвязывающий домен обычно представляет собой scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент). Размер scFv как правило составляет 1/6 от полноразмерного антитела. Одноцепочечное антитело предпочтительно представляет аминокислотную последовательность цепи, кодируемой нуклеотидной цепью. В качестве предпочтительного воплощения настоящего изобретения scFv содержит антитела, которые специфически распознают CD19 и CD20.

В отношении шарнирной области и трансмембранной области (трансмембранного домена) CAR может быть сконструирован таким образом, чтобы

содержать трансмембранный домен, слитой с внеклеточным доменом CAR. В одном из воплощений используется трансмембранный домен, который естественным образом ассоциирован с одним из доменов CAR. В некоторых воплощениях трансмембранные домены могут быть выбраны или модифицированы путем аминокислотных замен для того, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранным доменом того же или другого белка поверхности мембраны, тем самым минимизируя взаимодействие с другими членами рецепторных комплексов.

Внутриклеточный домен в CAR по изобретению содержит сигнальный домен 4-1ВВ и сигнальный домен CD3ζ.

Предпочтительно, структура CAR по настоящему изобретению, в свою очередь, содержит последовательность сигнального пептида (также известную как лидерная последовательность), последовательность распознавания антигена (антигенсвязывающий домен), шарнирную область, трансмембранную область, сигнальную область костимулирующего фактора и сигнальную область CD3зета (фрагмент ζ цепи). Порядок связи представлен на фиг. 1.

В еще одном предпочтительном воплощении CAR по настоящему изобретению представляет собой TN-LEU-19. Антигенсвязывающий домен антитела, нацеленный на CD20, содержит последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1) и последовательность легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 2) одноцепочечной вариабельной области, полученной из антитела Leu16.

Последовательность тяжелой цепи одноцепочечной вариабельной области (V<sub>H</sub>), полученной из антитела Leu16:

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT<u>SYNMH</u>WVKQTPGQGLEWIG <u>AIYPGNGDTSYNQKFKG</u>KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR<u>SNYYG</u> <u>SSYWFFDV</u>WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

LEU-VH-CDR1: SEQ ID NO: 1, положения 31-35;

LEU -VH-CDR2: SEQ ID NO: 1, положения 50-66;

LEU -VH-CDR3: SEQ ID NO: 1, положения 99-111.

Последовательность легкой цепи одноцепочечной вариабельной области ( $V_L$ ), полученной из антитела Leu16:

DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTC<u>RASSSVNYMD</u>WYQKKPGSSPKPWIY<u>ATS</u>
<u>NLAS</u>GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC<u>QQWSFNPPT</u>FGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 2)

LEU-VL-CDR1: SEQ ID NO: 2, положения 24-33; LEU -VL-CDR2: SEQ ID NO: 2, положения 49-55; LEU -VL-CDR3: SEQ ID NO: 2, положения 88-96.

| Область<br>Leu16     | Последовательность                               | Остатки   | Длина |
|----------------------|--|-----------|-------|
| HFR1                 | EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT (SEQ ID NO: 46)   | 1 - 30    | 30    |
| V <sub>H</sub> -CDR1 | SYNMH (SEQ ID NO: 47)                            | 31 - 35   | 5     |
| HFR2                 | WVKQTPGQGLEWIG (SEQ ID NO: 48)                   | 36 - 49   | 14    |
| V <sub>H</sub> -CDR2 | AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 49)                | 50 - 66   | 17    |
| HFR3                 | KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR (SEQ ID NO: 50) | 67 - 98   | 32    |
| V <sub>H</sub> -CDR3 | SNYYGSSYWFFDV (SEQ ID NO: 51)                    | 99 - 111  | 13    |
| HFR4                 | WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 52)                      | 112 - 122 | 11    |
| Leu16 V <sub>H</sub> |  | •         | 122   |

| Область              | Последовательность                                  | Остатки  | Длина |  |
|----------------------|---|----------|-------|--|
| Leu16                |   |          |       |  |
| LFR1                 | DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTC (SEQ ID NO: 53)             | 1 - 23   | 23    |  |
| V <sub>L</sub> -CDR1 | RASSSVNYMD (SEQ ID NO: 54)                          | 24 - 33  | 10    |  |
| LFR2                 | WYQKKPGSSPKPWIY (SEQ ID NO: 55)                     | 34 - 48  | 15    |  |
| V <sub>L</sub> -CDR2 | ATSNLAS (SEQ ID NO: 56)                             | 49 - 55  | 7     |  |
| LFR3                 | GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC<br>(SEQ ID NO: 57) | 56 - 87  | 32    |  |
| V <sub>L</sub> -CDR3 | QQWSFNPPT (SEQ ID NO: 58)                           | 88 - 96  | 9     |  |
| LFR4                 | FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 59)                          | 97 - 106 | 10    |  |
| Leu16 V <sub>L</sub> |   |          |       |  |

В еще одном предпочтительном воплощении CAR по настоящему изобретению представляет собой TN-OF-19. Антигенсвязывающий домен антитела,

нацеленный на CD20, содержит последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 3) и последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 4) одноцепочечной вариабельной области, полученной из антитела офатумумаба.

Последовательность тяжелой цепи одноцепочечной вариабельной области (VH), полученной из антитела офатумумаба:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTF<u>NDYAMH</u>WVRQAPGKGLEWVS <u>TISWNSGSIGYADSVKG</u>RFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK<u>DIQYG</u> <u>NYYYGMDV</u>WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 3)

OF-VH-CDR1: SEQ ID NO: 3, положения 30-35. Последовательность OF-VH-CDR1 представляет собой: NDYAMH (SEQ ID NO: 40).

OF-VH-CDR2: SEQ ID NO: 3, положения 50-66. Последовательность OF-VH-CDR2 представляет собой: TISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO: 41).

OF-VH-CDR3: SEQ ID NO: 3, положения 99-111. Последовательность OF-VH-CDR3 представляет собой: DIQYGNYYYGMDV (SEQ ID NO: 42).

Последовательность легкой цепи одноцепочечной вариабельной области (VL), полученной из антитела офатумумаба:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQSVSSYLA</u>WYQQKPGQAPRLLIY<u>DAS</u>

<u>NRAT</u>GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC<u>QQRSNWPIT</u>FGQGTRLEIK

(SEQ ID NO: 4)

OF-VL-CDR1: SEQ ID NO: 4, положения 24-34. Последовательность OF-VL-CDR1 представляет собой: RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 43).

OF-VL-CDR2: SEQ ID NO: 4, положения 50-56. Последовательность OF-VL-CDR2 представляет собой: DASNRAT (SEQ ID NO: 44).

OF-VL-CDR3: SEQ ID NO: 4, положения 89-97. Последовательность OF-VL-CDR3 представляет собой: QQRSNWPIT (SEQ ID NO: 45).

В еще одном предпочтительном воплощении антигенсвязывающий домен, нацеленный на CD19, в CAR по настоящему изобретению содержит последовательность одноцепочечной вариабельной области легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 5) и последовательность одноцепочечной вариабельной области тяжелой цепи (VH) (SEQ ID NO: 6), полученных из антитела FMC63.

Аминокислотная последовательность одноцепочечной вариабельной области легкой цепи ( $V_L$ ) получена из антитела FMC63:

 ${\tt DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC} {\color{red}{\bf RASQDISKYLN}} {\tt WYQQKPDGTVKLLIY} {\color{red}{\bf HT}}$ 

## <u>SRLHS</u>GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC<u>QQGNTLPYT</u>FGGGTKLEIT( SEQ ID NO: 5)

FMC63-VL-CDR1: SEQ ID NO: 5, положения 24-34. Последовательность FMC63-VL-CDR1 представляет собой: RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 63).

FMC63-VL-CDR2: SEQ ID NO: 5, положения 50-56. Последовательность FMC63-VL-CDR2 представляет собой: HTSRLHS (SEQ ID NO: 64).

FMC63-VL-CDR3: SEQ ID NO: 5, положения 89-97. Последовательность FMC63-VL-CDR3 представляет собой: QQGNTLPYT (SEQ ID NO: 39).

Нуклеотидная последовательность одноцепочечной вариабельной области легкой цепи ( $V_L$ ) получена из антитела FMC63:

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60 atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aaatatttaa attggtatca gcagaaacca 120 gatggaactg ttaaactcct gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg 300 gggaccaagc tggaggatcac a 321 (SEQ ID NO: 21)

Аминокислотная последовательность одноцепочечной вариабельной области тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) получена из антитела FMC63:

# EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP<u>DYGVS</u>WIRQPPRKGLEWLG<u>VI</u> <u>WGSETTYYNSALKS</u>RLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAK<u>HYYYGGSY</u> <u>AMDY</u>WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 6)

FMC63-VH-CDR1: SEQ ID NO: 6, положения 31-35. Последовательность FMC63-VH-CDR1 представляет собой: DYGVS (SEQ ID NO: 60).

FMC63-VH-CDR2: SEQ ID NO: 6, положения 50-65. Последовательность FMC63-VH-CDR2 представляет собой: VIWGSETTYYNSALKS (SEQ ID NO: 61).

FMC63-VH-CDR3: SEQ ID NO: 6, положения 98-109. Последовательность FMC63-VH-CDR3 представляет собой: HYYYGGSYAMDY (SEQ ID NO: 62).

Нуклеотидная последовательность одноцепочечной вариабельной области тяжелой цепи (VH) получена из антитела FMC63:

gaggtgaaac tgcaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccgtc 60 acatgcactg tctcaggggt ctcattaccc gactatggtg taagctggat tcgccagcct 120 ccacgaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggta gtgaaaccac atactataat 180 tcagctctca aatccagact gaccatcatc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240

aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatttact actgtgccaa acattattac 300 tacggtggta gctatgctat ggactactgg ggccaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360 (SEQ ID NO: 22)

В частности, последовательности других элементов в CAR по настоящему изобретению являются следующими:

Лидерная последовательность представляет собой лидерную последовательность антигена CD8:

### MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 8)

Линкерные последовательности (т.е. гибкий линкер I) между одноцепочечными вариабельными областями тяжелой цепи и легкой цепи представляют собой:

Аминокислотная последовательность линкера между V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> в CD20 scfv:

GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 19)

Аминокислотная последовательность линкера между V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> в CD19 scFv:

GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 20)

Шарнирная область выбрана из последовательности короткой формы шарнира IgG4:

ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 9)

Трансмембранная область представляет собой последовательность трансмембранной области антигена CD8 (CD8TM) или CD28 (CD28TM):

CD8TM: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 10)

CD28TM: MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 11)

Сигнальная область костимулирующего фактора получена из последовательности цитоплазматического сигнального мотива 4-1BB или CD28:

4-1BB: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 12)

CD28: RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 13)

Сигнальная область  $CD3\zeta$  получена из последовательности активирующего мотива иммунорецептора на основе тирозина (ITAM)  $CD3\zeta$  в комплексе TCR:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR (SEQ ID NO: 14). В предпочтительном воплощении полноразмерные последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности двух САR, сконструированных в настоящем изобретении, являются следующими:

Полноразмерная последовательность нуклеиновой кислоты TN-OF-19 является следующей:

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCA CGCCGCCAGGCCGGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCT ACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GATGCATCCAACAGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG TTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAAGGCAGTACTAGCGGTGGTGGCTCCGGGGGGCGGTTCCGG TGGGGGCGCAGCAGCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAAT GATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGT  ${\sf CTCAACTATTAGTTGGAATAGTGGTTCCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGG}$ GCCGATTCACCATCTCCAGAGACACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATG AACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATATACA GTACGCCAACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA CCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCT GGCCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGT GAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCCAGGAAGGGCC TGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCC  ${\tt CTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCT}$ GAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGC ACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGC GTGACCGTGAGCAGCGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCG AGGGCAGCACCAAGGGCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAG GCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTG ATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAG CGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATA

Полноразмерная аминокислотная последовательность TN-OF-19 является следующей:

MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS
YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
QQRSNWPITFGQGTRLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGSSEVQLVESGGGLVQPGRSLR
LSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDN
AKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGS
EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSET
TYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYW
GQGTSVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI
SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT
YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTV
AFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
(SEQ ID NO: 16)

Полноразмерная последовательность нуклеиновой кислоты TN-LEU-19 является следующей:

 $ATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAG\\GTTCCACAGGTGACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTATCCTGTCTGCATCTC\\$ 

CAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAATTACATG GACTGGTACCAGAAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCCTGGATTTATGCCAC ATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC  ${\sf CTCTTACTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTA}$ CTGCCAGCAGTGGAGTTTTAATCCACCCACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGG AAATAAAAGGCAGTACTAGCGGTGGTGGCTCCGGGGGCGGTTCCGGTGGGGG CGGCAGCAGCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTA CAATATGCACTGGGTAAAGCAGACACCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGA GCTATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAA GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCA GCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGACTATTACTGTGCAAGATCTAATTATTACG GTAGTAGCTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCAGGAGGTGGATCCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCT GGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCC TGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGAAGGGCCTGGAA TGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAA GAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAG ATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTA  ${\sf CTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGA}$ CCGTGAGCAGCGGCAGCACCTCCGGCAGCGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGG CAGCACCAAGGGCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCA GTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTGCTGATCT ACCACACCAGCCGCTGCACAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGC TCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGC CACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAA CAAAGCTGGAAATCACCGAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTCGGAGGCGTGCTGCCTGCTACAGCCTGCT TGTATATATCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAA GATGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGATGTGAACTGC GGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA

TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTG
GATAAGCGGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGA
ACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC
CTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGAC
GGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCA
CATGCAGGCCCTGCCCCCAAGG(SEQ ID NO:17).

Полноразмерная аминокислотная последовательность TN-LEU-19 является следующей:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD
WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFN
PPTFGGGTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGSSEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKA
SGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST
AYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSEVKLQ
ESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNS
ALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS
VTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWY
QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY
TFGGGTKLEITESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRK
KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:15).

Конструкция BICAR по настоящему изобретению имеет следующие преимущества:

Во-первых, CD19 и CD20 экспрессируются в большинстве злокачественных Вклеточных опухолей. Во-вторых, в целом, при расширении структуры CAR для того, чтобы увеличить способность к распознаванию Т-клеток, часто сталкиваются с такими проблемами, как увеличенное неблагоприятное связывание с мишенями, увеличенная цитотоксичность и увеличенные побочные эффекты. Тем не менее, это не относится к CD19 и CD20, поскольку оба они экспрессируются только в В-клетках с одинаковой кривой опухолевой токсичности. Наконец, экспрессия CD19 и CD20 в В-клетках может способствовать выживанию В-клеток. А потеря обоих антигенов во время лечения представляет собой событие с очень низкой вероятностью. Таким образом, ожидается, что нацеливание против CD19 и CD20 обеспечит эффективное предупреждение антигенного ускользания злокачественных В-клеток.

По сравнению с одиночным CAR против CD19 или против CD20, BICAR имеет следующие преимущества:

Во-первых, по сравнению с экспрессией двух независимых САR при экспрессии ВІСАR в одной Т-клетке область узнавания ДНК значительно уменьшается (длина ДНК уменьшается на 40%). Размер и длина структуры могут значительно влиять на эффективность упаковки и трансдукции вирусного вектор, таким образом, непосредственно влияя на клиническую эффективность. Во-вторых, по сравнению со смесью двух различных отдельных САR ВІСАR может значительно уменьшить стоимость лечения (ВІСАR полностью совместим с текущим процессом получения Т-клеток без добавления дополнительной нагрузки) и увеличить частоту клинического излечения. Наконец, СD19 и CD20 были проверены в большом количестве клинических исследований и являются относительно безопасными.

В настоящем изобретении авторы изобретения сконструировали два типа структуры химерных антигенных рецепторов (TN-LEU-19, TH-19), нацеленных на CD19 и CD20, на основе последовательности полученного от мыши моноклонального антитела FMC63 против CD19 и последовательности полученного от мыши моноклонального антитела leu-16 против CD20 и офатумумаба. Авторы изобретения завершили анализ и идентификацию уровней экспрессии, способность активации *im vitro*, и эффективность уничтожения опухолевых клеток для этих двух химерных антигенных рецепторов в первичных Т-клетках. Наконец, обнаружили, что Т-клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами TN-LEU-19 или TH-OF-19, обладают сильной способностью уничтожать *in vitro* и устранять злокачественные опухоли, несущие положительные в отношении CD19 и CD20 антигены *in vivo*, а также то, что офатумумаб лучше, чем leu16. Вышеуказанное обеспечивает новый эффективный способ и препарат для клинического применения CAR-T при лечении CD19 и CD20-положительных лейкозов и лимфом.

В настоящем изобретении разработаны и оптимизированы односпецифические и двухспецифические САR. Эти САR обладают мощной уничтожающей способностью против В-клеточных злокачественных новообразований, экспрессирующих СD19 или CD20. BICAR позволяет единичному Т-клеточному

продукту нацеливаться против двух клинически валидированных антигенов, ассоциированных с В-клеточным лейкозом и лимфомой, что в конечном итоге уменьшает риск рецидива опухоли из-за утраты или ускользания одного антигена. Настоящее изобретение может быть дополнительно использовано при разработке нового BICAR, что увеличивает применимость антигена и увеличивает эффективность Т-клеточной терапии рака.

#### Т-клетка с химерным антигенным рецептором (CAR-T-клетка)

Используемые здесь термины "CAR-T-клетка", "CAR-T", "CAR-T", "CAR-T-клетка по настоящему изобретению" относятся к CAR-T-клетке, которая нацелена против как CD19, так и CD20 в соответствии с последующим аспектом изобретения. В частности, структура CAR в CAR-T-клетках содержит в свою очередь scFv против CD19, scFv против CD20, шарнирную область, трансмембранную область и внутриклеточную Т-клеточную сигнальную область, где scFv против CD20 и scFv против CD19 связаны с пептидом, имеющим множество повторяющихся структур (G4S). По сравнению с CAR-T, нацеленными на один антиген, CAR-T-клетка, которая одновременно распознает две мишени, является более смертоносной и обладает более широким диапазоном лечения.

#### Вектор

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие требуемые молекулы, могут быть получены при помощи способов рекомбинации, известных в области техники, таких как, например, скрининг библиотек экспрессирующих ген клеток, путем получения гена из вектора, который, как известно, содержит его, или путем выделения непосредственно из клеток и тканей, содержащих ген, с использованием стандартных спосбов. Альтернативно, интересующий ген может быть получен синтетически.

В настоящем изобретении также предложены векторы, в которые встроена экспрессирующая кассета по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, представляют собой подходящие инструменты для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную, стабильную интеграцию трансгена и его распространение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы имеют преимущество перед векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы мышиного лейкоза, заключающееся в том, что они могут трансдуцироваться в непролиферирующие

клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают преимуществом, заключающимся в низкой иммуногенности.

Вкратце, экспрессирующая кассета или последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению типично и функционально связана с промотором, и включена в экспрессирующий вектор. Векторы могут быть подходящими для репликации и интеграции в эукариоты. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, инициирующие последовательности и промоторы, полезные для регуляции экспрессии желаемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Экспрессирующие конструкции по настоящему изобретению также могут быть использованы для иммунной и генной терапии нуклеиновыми кислотами с использованием стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в области техники. Смотри, например, патенты США № 5399346, 5580859, 5589466, включенные сюда путем ссылки во всей своей полноте. В еще одном воплощении в изобретении предложен вектор для генной терапии.

Нуклеиновая кислота может быть клонирована в множество типов векторов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включающий без ограничения плазмиду, фагмиду, производное фага, животный вирус и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают экспрессирующие векторы, векторы для репликации, векторы для генерирования зондов и векторы для секвенирования.

Дополнительно экспрессирующий вектор может быть введен в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусного вектора хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al, (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые являются полезными в качестве векторов, включают, без ограничения, ретровирусы, аденовирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В общем, подходящий вектор содержит ориджин репликации, функциональный, по меньшей мере, в одном организме, промоторную последовательность, сайты рестрикции для эндонуклеазы и один или более чем один селективный маркер (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 удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген может быть встроен в вектор и упакован в ретровирусные частицы с использованием способов, известных в области техники. Рекомбинантный вирус затем может быть выделен и доставлен в клетки субъекта *in vivo* или *ex vivo*. Множество ретровирусных систем известны в области техники. В некоторых воплощениях используют аденовирусные векторы. Множество аденовирусных векторов известны в области техники. В одном из воплощений используют лентивирусные векторы.

Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области 30-110 п.о. против хода транскрипции относительно сайта инициации, хотя недавно было показано, что множество промоторов также содержат функциональные элементы по ходу транскрипции относительно сайта инициации. Расстояние между промоторными элементами часто является нежестким, лишь бы только промотерная функция сохранялась, когда элементы инвертируются или перемещаются друг относительно друга. В тимидинкиназном промоторе (tk) расстояние между элементами промотора может быть увеличено до 50 п.н. прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора предполагают то, что отдельные элементы могут функционировать для активации транскрипции как совместно, так и независимо,.

Один из примеров подходящего промотора является последовательность немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная сильную последовательность представляет собой последовательность конститутивного промотора, способствующую высоким уровням экспрессии любой функционально связанной с ней полинуклеотидной последовательности. Другим примером подходящего промотора является фактор продолжения роста  $1\alpha$  (EF-  $1\alpha$ ). Тем не менее, также может быть использована другая последовательность конститутивного промотора, включая, без ограничения, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинных концевых повторов (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса птичьего лейкоза, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы человеческих генов, такие как без ограничения промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того,

настоящее изобретение не должно ограничиваться использованием конститутивных промоторов, индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть изобретения. В качестве используемого индуцируемого промотора предложен молекулярный выключатель, способный к включению экспрессии полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия желательна, или выключению экспрессии, когда она не желательна. Примеры индуцируемых промоторов включают, без ограничения, металлотионеиновый промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор.

CAR Для оценки экспрессии полипептида или его фрагментов экспрессирующий вектор, вводимый в клетку, также может содержать селективный маркерный ген, или ген-репортер, или оба из них, для облегчения как идентификации, так и отбора, экспрессирующих клеток из популяции клеток, подлежащих трансфекции или инфицированию вирусными векторами. В других аспектах селективный маркер может находиться на отдельном фрагменте ДНК и использоваться в процедуре ко-трансфекции. Как селективные маркеры, так и генырепортеры, могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для того, чтобы обеспечить экспрессию в клетках-хозяевах. Пригодные селективные маркеры содержат, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как пео и т.п.

идентификация Гены-репортеры используются потенциально для трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В общем, ген-репортер представляет собой ген, который не присутствует в организме-реципиенте или ткани или не экспрессируется в них и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется некоторым легко детектируемым свойством, например ферментативной активностью. Экспрессию гена-репортера анализируют в подходящий момент времени после введения ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие гены-репортеры могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных способов или приобретены. В общем, конструкция с минимальной 5' фланкирующей областью, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии гена-репортера, идентифицирована в качестве промотора. Такие промоторные области могут быть связаны с геном-репортером и используются для оценки агентов в отношении способности модулировать транскрипцию, управляемую промотором.

Способы введения и экспрессии генов в клетку известны в области техники. В контексте экспрессирующего вектора, он может быть легко введен в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающего, бактериальную клетку, дрожжевую клетку или клетку насекомого при помощи любого способа в области техники. Например, экспрессирующий вектор может быть трансфицирован в клетку-хозяина при помощи физического, химического или биологического средства.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, миероинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в области техники. Смотри, например, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция при помощи фосфата кальция.

Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы и, в особенности, ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом для встраивания генов в клетки млекопитающих, например, человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. Смотри, например, патенты США № 5350674 и 5585362.

Химические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, бусинки и основанные на липидах системы, включающие эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примером коллоидной системы для применения в качестве носителя для доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, везикула с искусственной мембраной).

В случае, когда используют невирусную систему доставки, тогда типичным средством доставки является липосома. Применение липидных композиций

рассматривается для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (in vitro, ex vivo или *in vivo*). В еще одном аспекте нуклеиновая кислота может быть ассоциирована с липидом. Нуклеиновая кислота, ассоциированная с липидом, может быть инкапсулирована в водной внутренней части липосомы, внутри липидного бислоя липосомы, присоединена к липосоме через связывающую молекулу, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захвачена липосомой, может образовывать комплекс с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, комбинирована с липидом, содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться в мицелле или образовывать комплекс с мицеллой или иным образом ассоциироваться с липидом. Композиции, ассоциирующиеся с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессирующимся вектором не ограничиваются какойлибо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в двухслойной структуре, такой как мицеллы или "коллапсированная" структура. Они также могут просто находиться в растворе, возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными по размеру или форме. Липиды представляют собой жиры, которые могут представлять собой природные или синтетические липиды. Например, липиды содержат жировые капли, которые естественным образом находятся в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

В одном из воплощений вектор представляет собой лентивирусный вектор.

## Препарат

В изобретении предложен препарат, содержащий САR-Т-клетку в соответствии с дальнейшим аспектом изобретения и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент. В одном из воплощений препарат представляет собой жидкий препарат. Предпочтительно, препарат представляет собой инъекцию. Предпочтительно, концентрация CAR-Т-клеток в препарате составляет  $1 \times 10^3$  -  $1 \times 10^8$  клеток/мл, более предпочтительно,  $1 \times 10^4$  -  $1 \times 10^7$  клеток/мл.

В одном из воплощений препарат может содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор и т.п; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатообразующие агенты, такие как EDTA или глутатион;

адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Препарат по изобретению предпочтительно готовят для внутривенного введения.

## Терапевтическое применение

Изобретение включает терапевтические применения с использованием клеток (например, Т-клеток), трансдуцированных лентивирусным вектором (LV), кодирующим экспрессирующуюся кассету по изобретению. Трансдуцированные Т-клетки могут быть нацелены против маркеров опухолевых клеток CD19 и CD20, синергистически активировать Т-клетки и вызывать Т-клеточные иммунные ответы, таким образом, значительно увеличивая эффективность уничтожения опухолевых клеток.

Таким образом, в настоящем изобретении также предложен способ стимулирования опосредованного Т-клетками иммунного ответа на популяцию клеток-мишеней или ткань млекопитающего, включающий стадию введения млекопитающему САR-Т-клетки по изобретению.

В одном из воплощений настоящее изобретение включает класс клеточной терапии, где Т-клетки аутологического пациента (или гетерологического донора) выделяют, активируют и генетически модифицируют для того, чтобы генерировать САR-Т-клетки, а затем инъецируют тому же самому пациенту. Вероятность заболевания трансплантат против хозяина в этом случае является крайне низкой, и антигены распознаются Т-клетками не ограниченным МНС образом. Кроме того, один CAR-Т может лечить все виды рака, которые экспрессируют данный антиген. В отличие от терапии антителом CAR-Т- клетки способны реплицироваться *in vivo*, что приводит в результате к длительной персистенции, что может привести к устойчивому контролю опухоли.

В одном из воплощений САR-Т-клетки по изобретению могут претерпевать устойчивое увеличение количества Т-клеток *in vivo* и могут сохраняться в течение длительного времени. Кроме того, опосредованный САR иммунный ответ может быть частью адаптивного подхода к иммунотерапии, при котором модифицированные САR Т-клетки вызывают иммунный ответ, специфичный для антигенсвязывающей группировки в САR. Например, САR-Т-клетка против СD19 и CD20 вызывает иммунный ответ специфичный в отношении Т-клеток, экспрессирующих CD19 и CD20.

Хотя раскрытые здесь данные, в частности, относятся к лентивирусному

вектору, содержащему CD19CD20 scFv, шарнирный и трансмембранный домен, а также сигнальные домены 4-1BB и CD3ζ, настоящее изобретение следует рассматривать как содержащее любое количество вариаций для каждого из компонентов описанной здесь конструкции.

Формы рака, которые можно лечить, включают опухоли, которые являются неваскуляризированными или в основном неваслуляризированными, и опухоли, которые являются васкуляризированными. Формы рака могут включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или солидные опухоли. Типы рака, подлежащие лечению при помощи CAR по изобретению, включают, без ограничения, карциному, бластому и саркому, и некоторые лейкозные или лимфоидные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Также включены формы опухолей/рака у взрослых и формы опухолей/рака у детей.

Гематологические виды рака представляют собой формы рака крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) видов рака включают лейкозы, включая острые лейкозы (такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, а также миелобластный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, миеломоноцитарный лейкоз, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (индолентные и высокозлокачественные формы), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей. миелодиспластический синдром, волосистоклеточный лейкоз миелодисплазию.

Солидные опухоли представляют собой аномальные массы тканей, которые обычно не содержат кисты или жидкие области. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухоли названы по типу образующих их клеток (такие как саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, мезотелиому, злокачественную лимфому, рак поджелудочной железы и рак яичника.

Модифицированные CAR Т-клетки по изобретению могут также служить в качестве типа вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или для терапии *in vivo* млекопитающего. Предпочтительно, млекопитающее представляет собой человека.

Относительно иммунизации *ex vivo* по меньшей мере одно из следующего происходит *in vitro* до введения клетки млекопитающему: 1) рост клеток, 2) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в клетки и/или 3) криоконсервация клеток.

Процедуры *ex vivo* хорошо известны в данной области техники и более подробно обсуждаются ниже. Вкратце, клетки выделяют у млекопитающего (предпочтительно, человека) и генетически модифицируют (т.е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) вектором, экспрессирующим CAR, раскрытый здесь. CAR-модифицированная клетка может быть введена реципиенту-млекопитающему для обеспечения терапевтической пользы. Реципиент-млекопитающее может представлять собой человека и CAR-модифицированная клетка может быть аутологической относительно реципиента. Альтернативно, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

В дополнение к использованию клеточной вакцины с точки зрения иммунизации *ex vivo*, в настоящем изобретении также предложены композиции и способы иммунизации *in vivo* для того, чтобы вызвать иммунный ответ, направленный против антигена у пациента.

В настоящем изобретении предложены способы лечения опухоли, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества CAR-модифицированных Т-клеток по изобретению.

CAR-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению могут быть введены сами по себе или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2, IL-17 или другие цитокины или клеточные популяции. Вкратце, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать популяцию описанных здесь клетокмишеней в комбинации с одним или более чем одним фармацевтически или физиологически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор и т.п; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты. такие как глицин; антиоксиданты;

хелатообразующие агенты, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно готовят для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены способом, подходящим для заболевания, подлежащего лечению (или предупреждению). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания пациента, хотя соответствующие дозы может быть определены в клинических исследованиях.

"иммунологически Когда указано эффективное количество", "противоопухолевое эффективное количество", "подавляющее опухоль эффективное количество" или "терапевтическое количество", тогда точное количество композиций по настоящему изобретению, которое должно быть введено, может быть определено лечащим врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состояния пациента (субъекта). Можно в общем утверждать то, что фармацевтическая композиция, содержащая описанные здесь Т-клетки, может быть введена в дозе от 10<sup>4</sup> до 10<sup>9</sup> клеток/кг массы тела, предпочтительно, от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела, включая все целочисленные значения в этих диапазонах. Композиции Т-клеток могут также вводить многократно в этих дозах. Клетки могут вводить с помощью способов инфузии, которые широко известны в иммунотерапии (смотри, например, Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Оптимальная доза и схема лечения для конкретного пациента могут быть легко определены специалистом в области медицины путем мониторинга пациента в отношении наличия признаков заболевания и соответствующей корректировки лечения.

Введение композиций по изобретению может быть осуществлено при помощи любого удобного способа, включая аэрозольную ингаляцию, инъекцию, прием внутрь, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Описанные здесь композиции могут быть введены пациенту подкожно, интрадермально, интратуморально, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенной (i.v.) инъекции или внутрибрюшинно. В одном из воплощений Тклеточные композиции по настоящему изобретению вводят пациенту путем интрадермальной или подкожной инъекции. В еще одном воплощении настоящего изобретения Т-клеточные композиции по настоящему изобретению предпочтительно

вводят путем i.v. инъекции. Композиции Т-клеток могут быть инъецированы непосредственно в опухоль, лимфатический узел или место инфекции.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения клетки, активированные и разросшиеся с использованием описанных здесь способов, или других способов, известных в области техники, при которых Т-клетки разрастаются до терапевтических уровней, вводят пациенту в сочетании с (например, перед, одновременно или после) любым количеством соответствующих способов лечения, включающих без ограничения лечение агентами, такими как противовирусная терапия, лечение цидофовиром и интерлейкином 2, цитарабином (также известным как ARA-C) или натализумабом пациентов, страдающих от MS, или лечение ефализумабом пациентов, страдающих от псориаза, или другие способы лечения пациентов, страдающих от РМL. В дополнительных воплощениях Т-клетки по изобретению могут быть использованы в комбинации с химиотерапией, облучением, иммуносупрессивными агентами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506 антитела или другие иммунотерапевтические агенты. В еще одном воплощении клеточные композиции по настоящему изобретению вводят пациенту вместе с (например, перед, одновременно или после) пересадкой костного мозга, или с использованием химиотерапевтических агентов, таких как флударабин, дистанционная лучевая терапия (XRT), циклофосфамид. Например, в одном из воплощений, субъекты может подвергаться стандартному лечению с помощью химиотерапии в высоких дозах с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых воплощениях после пересадки субъектам осуществляют инфузию разросшихся иммунных клеток по настоящему изобретению. В еще одном воплощении разросшиеся клетки вводят до или после хирургической операции.

Доза вышеприведенных способов лечения, подлежащая введению пациенту, будет варьировать в зависимости от конкретной природы состояния, подлежащего лечению, и от реципиента, которого лечат. Масштабирование доз для введения пациенту может быть осуществлено в соответствии с принятой в области техники практикой. В общем, от  $1\times10^6$  до  $1\times10^{10}$  модифицированных Т-клеток по изобретению (например, клетки CAR-T-19/20) может быть введено пациентам при помощи, например, внутривенной инфузии при каждом лечении или при каждом курсе лечения.

Преимущества настоящего изобретения представляют собой:

- (1) Что касается химерного антигенного рецептора по настоящему изобретению, внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой специфичные scFv, против CD20 и scFv против CD19; CAR, образованный путем комбинирования специфичных scFv против CD20 и scFv против CD19 со специфичной шарнирной областью и внутриклеточным доменом демонстрирует отличную способность уничтожать опухолевые клетки с низкой цитотоксичностью и низкими побочными эффектами.
- (2) Химерный антигенный рецептор, предложенный в изобретении, может обеспечивать стабильную экспрессию и мембранную локализацию белка CAR после инфицирования Т-клеток лентивирусом, несущим ген CAR.
- (3) САR-модифицированная Т-клетка по настоящему изобретению обладает более длительной продолжительностью жизни *in vivo* и сильной противоопухолевой эффективностью; оптимизированный САR с линкерной областью шарнир IgG4-CH2-CH3 может избегать связывания с рецептором Fc и последующего эффекта ADCC (антителозависимая цитотоксичность).
- (4) По сравнению с двумя независимыми САпечR биспецифичный химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению содержит как scFv против CD20, так и scFv против CD19, и область узнавания ДНК значительно уменьшается (длина ДНК уменьшается на 40%), и размер структуры является небольшим, что благоприятно для упаковки и эффективности трансдукции вирусных векторов, за счет этого непосредственно улучшая клиническую эффективность. Кроме того, биспецифичный CAR по изобретению обладает меньшей стоимостью, более высокой эффективностью лечения и большей безопасностью.
- (5) Т-Клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами TN-LEU-19 или TH-OF-19 по настоящему изобретению, обладают очень сильной способностью уничтожения *in vitro* и устранения злокачественных опухолей, несущих CD19 и CD20 положительные антигены *in vivo*, и офатумумаб является более сильным. Это обеспечивает новый эффективный способ и препарат для клинического применения CAR-T в лечении CD19 и CD20-положительных лейкозов и лимфом.
- (6) САR-Т-клетки по настоящему изобретению обладают уничтожающим действием в отношении большинства злокачественных В-клеточных опухолей, обладают более широким диапазоном лечения и большим уровнем охвата, и могут

более эффективно предупреждать ускользание от иммунного ответа опухолевых клеток.

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано ниже со ссылкой на конкретные примеры. Понятно, что эти примеры приведены исключительно для иллюстративных задач и не предполагается, что они ограничивают объем изобретения. Экспериментальные способы без специфичных условий, описанных в следующих примерах, как правило осуществляют в обычных условиях или в соответствии с указаниями производителя. Если не указано иное, то процентные доли и части являются долями и частями по массе.

## Пример 1 Конструирование лентивирусного экспрессирующего вектора

Полноразмерную ДНК синтезировали и клонировали для конструирования кодирующих плазмид. Лентивирусный вектор рWPT был выбран в качестве вектора для клонирования, и сайты клонирования представляли собой сайты BamHI и SalI. Структуры двух CAR, сконструированных в настоящем изобретении, представлены на фиг. 1. Аминокислотная последовательность TN-LEU-19 представлена в SEQ ID NO: 15, и аминокислотная последовательность TN-OF-19 представлена в SEQ ID NO: 16 (со структурой L-(OF)VL-(OF)VH-I-(FMC63)VH-(FMC63)VL-H-TM-C-CD3ζ).

# Пример 2 Обнаружение активирующей способности биспецифичных CAR in vitro

**PBMC** выделяли ИЗ венозной крови здорового донора путем центрифугирования в градиенте плотности. На 0 сутки РВМС активировали во флаконе для клеточной культуры, предварительно покрытым моноклональным антителом CD3 (ОКТ3) и ретронектином (ТАКАRA). Среда представляла собой клеточную культуральную среду GT-551, содержащую 1% человеческий альбумин и 300 Е/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина 2 (IL-2). На 3 сутки **PBMC** TN-LEU-19 активированные трансдуцировали очищенным или лентивирусным раствором TN-OF-19. Начинаясь с 6 суток CAR-T-клетки TN-OF-19 и TN-LEU-19 могут быть собраны для соответствующего анализа активности. Способ с белком L использовали для определения уровня экспрессии белка, кодируемого геном САЯ, на поверхности Т-клеточной мембраны в САЯ-Т-клетках, культивируемых в течение 7 суток.

Маркер Т-клеточной активации CD137 и высвобождение IFNγ обнаружили с использованием CD19/20 биспецифичных CAR-Т-клеткок, кульктивируемых в

течение 7 суток.  $1\times10^5$  CAR-Т-клеток культивировали совместно соответственно с CD19, CD20-позитивными опухолевыми клеточными линиями K562-CD19+, K562-CD20+, K562-CD19+CD20+ и Raji (экспрессирующая в природе CD19 и CD20), а также CD19CD20-отрицательной опухолевой клеточной линией K562 или без опухолевых клеток в 200 мкл среды GT-551 в течение 18 ч с отношением 1:1. Затем соответственно обнаруживали уровень экспрессии CD137 на поверхности Т-клеток и уровень секреции IFN $\gamma$  в культуральном супернатанте.

Результаты показаны на фиг. 2A и 2B. Была обнаружена экспрессия CD137 на поверхности двух CAR Т-клеток, и была обнаружена экспрессия IFN $\gamma$  в культуральных супернатантах. Причем, клетки TN-OF-19 имеют более высокий уровень активации CD137 и высвобождения IFN $\gamma$ , чем TN-LEU-19.

# Пример 3 Идентификация оптимального антигенсвязывающего домена для биспецифичных CAR против CD19/CD20

Авторы изобретения приготовили два биспецифичных CAR, имеющих одинаковые scFv против CD20 и scFv против CD19, но с отличающимся порядком: у TN-OF-19 (C-CAR039) есть scFv против CD20 ("OF"), который находится перед scFv против CD19 ("FMC63"), тогда как у TN-19-OF есть scFv против CD19 ("FMC63"), который находится перед scFv против CD20 ("OF") (фиг. 16A).

Как показано на фиг.16В, TN-OF-19 (C-CAR039) демонстрируют более высокие активности *in vitro* (например, вызывающие высвобождение интерферона-γ или IFN-γ) против CD19 и CD20-положительных клеток, чем CAR-T20-29 (V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>).

Кроме того, авторы изобретения приготовили различные биспецифичные CAR, имеющие одинаковый порядок scFv против CD20 и scFv против CD19 (т.е. scFv против CD20 ("OF"), а затем scFv против CD19 ("FMC63")), но с отличающимся порядком  $V_H$  и  $V_L$  в scFv против CD20 (OF) или в scFv против CD19 (FMC63) (фиг. 16C).

Как показано на фиг. 16D, TN-OF-19 (C-CAR039) демонстрирует превосходящие противоопухолевые активности по сравнению с другими биспецифичными CAR с отличающимся порядком  $V_{\rm H}$  и  $V_{\rm L}$ .

Данные авторов изобретения *in vitro* демонстрируют то, что порядок scFv против CD20 и scFv против CD19 в биспецифичном CAR, а также порядок  $V_H$  и  $V_L$  в scFv, может влиять на свойства биспецифичного CAR.

#### Пример 4 Обнаружение циитотоксичности CD19/20 биспецифичных CAR-

#### Т-клеток in vitro

САR-Т-клетки, полученные в примере 2, тестировали в отношении цитотоксичности с помощью анализа высвобождения LDH. Клетки-мишени представляют собой клетки K562, K562-CD19+, K562-CD20+, K562-CD19+CD20+ и клетки Raji; и эффекторные клетки представляют собой клетки NT, TN-LEU-19 и TN-OF-19. Устанавливали соотношение эффект-мишень, где количество эффекторных клеток: количество клеток-мишеней = 5:1, 10:1, 20:1 и 40:1. Результаты показаны на фиг. 3A. Как TN-LEU-19 клетки, так и TN-OF-19 CAR-Т-клетки, могут хорошо индуцировать апоптоз и высвобождение LDH у CD19/20-положительных опухолевых клеток.

Уровни высвобождения CD107а (маркера дегрануляции Т-клеток) во время уничтожения опухолевых клеток, вызванного клетками CAR-T19/20, анализировали путем проточной цитометрии. 1 × 10<sup>5</sup> эффективных клеток CAR-T19/20 (TN-OF-19 и TN-LEU-19) выращивали вместе, соответственно, с 2 × 10<sup>5</sup> опухолевых клетокмишеней. Клетки-мишени представляют собой, соответственно, клетки K562-CD19+, K562-CD20+, K562-CD19+CD20+ и клетки K562, клетки Raji, клетки Romas (CD19+CD20+). Результаты показаны на фиг. 3В. Обе популяции CART-клеток могут хорошо индуцировать высвобождение CD107а во время уничтожения опухолевых клеток. Причем, клетки TN-OF-19 обеспечивают немного более высокое высвобождение CD107а в качестве маркера цитотоксичности, чем клетки TN-LEU-19.

# Пример 5 Ингибирующее действие CAR-T19/20 на трансплантированные опухолевые клетки у мышей

Опухолевые клетки, которые инъецировали животным, представляли собой клетки Raji, несущие репортерный ген люциферазы (Raji, экспрессирующий люциферазу). В этом эксперименте опухолевые клетки Raji вводили и выращивали у мышей в течение одной недели, и затем инъецировали эффекторные Т-клетки. Эффекторные Т-клетки разделяли на три группы: NT, TN-LEU-19 и TN-OF-19. Разросшиеся эффекторные Т-клетки инъецировали мышам NSG через хвостовую вену, и затем интенсивность флуоресценции мышей (путем флуоресцентной визуализации IVIS) и вес мышей регистрировали каждые 7 суток. Эксперимент останавливали на 21-е сутки, и статистические результаты анализировали.

Результаты показаны на фиг. 4А-4С. На фиг.4А показано изменение массы мышей после инъекции эффекторных Т-клеток трем группам мышей. По сравнению

с двумя типами CAR Т-клеток CART-TN-OF-19 и CART-TN-LEU-19 мыши NT продемонстрировали значительное уменьшение массы тела, а мыши в обеих группах CART-клеток слегка увеличивали массу. Для исследований in vivo мышей NSG ксенотрансплантировали клетками Raji-Luc, которые представляют собой клетки Raji лимфомы Беркитта человека, экспрессирующие люциферазу светлячка в качестве репортера. Мышам затем вводили различные САR-Т-клетки или отрицательный контроль. Интенсивность флуоресценции у животных, ксенотрансплантированных Raji-Luc, анализировали после обработки, что отражало пролиферацию опухолевых клеток у животных. На фиг. 4В показана средняя интенсивность флуоресценции у трех групп мышей. Результаты демонстрируют то, что средняя интенсивность флуоресценции у мышей в группе NT значительно увеличилась, тогда как средняя величина интенсивностей флуоресценции у мышей в двух группах CAR Т-клеток уменьшилась, что указывает на то, что как TN-OF-19 клетки, так и TN-LEU-19 CAR Т-клетки, могут ингибировать рост опухоли по сравнению с NT. Причем клетки TN-OF-19 обеспечивают лучшее ингибирование опухолевого роста, чем клетки TN-LEU-19 после 14 суток, и кривая опухолевого роста в группе TN-LEU-19 значительно Ha фиг. 4C показана визуализация IVIS интенсивности релапсировала. флуоресценции в двух группах CAR Т-клеток и группе NT. TN-19 CAR-Т-клетки могут ингибировать или уничтожать опухолевые клетки *in vivo* лучше, чем клетки TN-LEU-19.

Таким образом, при сравнении CD20/CD19 bi-CAR с Leu16 scFv (используемым в клинических исследованиях Nirav NS или Tong C) C-CAR039 продемонстрировали превосходную противоопухолевую активность против как одиночных положительных, так и двойных положительных опухолевых мишеней *in vitro* и *in vivo*.

# Пример 6 Сравнение ингибирующего действия TN-OF-19 CAR-T-клеток и CD19 специфичных CAR-T-клеток *in vivo*

1×10<sup>6</sup> клеток Raji, экспрессирующих люциферазу светлячка, вводили 6-8недельным мышам NPG (NOD-Cg.PrkdcSCID IL-2Rgcnull/vst) путем инъекции в хвостовую вену. Через семь суток после трансплантации опухоли измеряли путем внутрибрюшинной инъекции D-люциферина и визуализации через 10-15 минут в течение 180 секунд в системе визуализации Bruker In Vivo Xtreme (Bruker, Xtreme BI). Мышей распределяли поровну на исследуемые группы (n = 6/группу) на основании опухолевой нагрузки. Группы TN-OF-19(L), TN-OF-19(M), TN-OF-19(H) по отдельности обрабатывали  $1\times10^6$ ,  $2,5\times10^6$  и  $5\times10^6$  САR + T- клеток путем инъекции в хвостовую вену.  $1\times10^6$  нетрансдуцированных T-клеток (N.T.) и направленные против одной мишени CD19-специфические CAR-T-клетки того же самого донора служили в качестве контролей. Рост опухоли оценивали на основе среднего излучения всего тела мыши на 7, 10, 21 сутки после инъекции. На фиг.5A показано, что биспецифичные TN-OF-19 CAR-T-клетки могут ингибировать или уничтожать опухолевые клетки лучше, чем CD19-специфические CAR-T-клетки *in vivo*. Особенно на ранней стадии лечения биспецифичные TN-OF-19 CAR-T демонстрируют значительно более быстрые ингибирующие эффекты. На фиг.5B показана визуализация IVIS интенсивности флуоресценции в 4 группах CAR-T-клеток и NT-группе.

## Пример 7 Антигенная специфичность CD20/CD19 биспецифичных CAR

Для изучения аффинности и специфичности биспецифичного scFv в TN-OF 19 CAR было получено химерное кроличье моноклональное антитело путем связывания CD20 scFv (например, полученное из офатумумаба mAb) и CD19 scFv (например, полученное из FMC63 mAb) в рамке с кроличьей областью IG1 Fc. CD19 и CD20 scFv альтернативно связывали с помощью линкера G4S. Молекулярный порядок представляет собой OF VL-VH-G4S-FMC63 VH-VL, который является таким же, что и в scFV в TN-OF-19. Химерное антитело экспрессировалось в клетках 293T после транзиентной трансфекции. Валидацию этого химерного антитела на специфичность окрашивания проводили при помощи проточной цитометрии. Вкратце, три линии (A549-CD19, A549-CD20, A549-CD19-CD20) стабильных клеточных использовались в качестве мишеней, и клетки CD19-CD20-A549 и клетки CD19+CD20+ Raji использовали в качестве контроля. Все клетки промывали и ресуспендировали, блокируя 2% сывороткой крови в течение 30 минут.  $5 \times 10^5$  клеток переносили в флаконы FACS, промывали и окрашивали рекомбинантными антителами (конечная концентрация 20 мкг/мл) в течение 1 ч при 4°С. После промывания добавляли вторичное антитело (козье антитело против кроличьего IgG) в темноте при 4°C в течение 30 минут. Наконец, клетки промывали и ресуспендировали в 200 мкл буфера FACS для анализа FACS. На фиг.6В показано химерное антитело, связанное с клетками с CD19 или CD20 или обоими, но не с клетками, лишенными обоих антигенов, что указывает на то, что для биспецифичного связывающегося домена требуется только один когнатный антиген для связывания, и не

образовывались никакие новые сайты специфического распознавания.

Перекрестная реактивность ткани и исследования матрицы мембранных протеомов по всему геному подтвердили специфичность связывания C-CAR039.

На фиг.17A показан процесс оценки специфичности связывания антигенсвязывающего домена C-CAR039. Таблица 1 демонстрирует, что сильное специфическое окрашивание мембраны обнаружено для человеческих лимфоцитах в крови, костном мозге, лимфатическом узле, селезенке, тимусе (исследование IHC GLP).

CD19, CD20 и FCGR1A идентифицировали при умеренном связывании с концентрациями 5,0 мкг/мл, никакие другие значимые взаимодействия не идентифицировали. Сообщали о том, что FCGR1 связывался с rabFc (фиг. 17В).

Таблица 1

| Ткань                | 2,0 мкг/мл       |       | 10,0 мкг/мл |         |       |       |
|----------------------|------------------|-------|-------------|---------|-------|-------|
|                      | Донор            | Донор | Донор       | Донор 1 | Донор | Донор |
|                      | 1                | 2     | 3           |         | 2     | 3     |
| Цитоплазматическая   | 2-1 <sup>a</sup> | 3-3   | 2-1         | 2-1     | 3-3   | 2-1   |
| мембрана рассеянных  |                  |       |             |         |       |       |
| лимфоцитов           |                  |       |             |         |       |       |
| в мочевом пузыре     |                  |       |             |         |       |       |
| Цитоплазматическая   | 2-1              | 2-1   | 2-1         | 2-1     | 2-1   | 2-1   |
| мембрана лимфоцитов  |                  |       |             |         |       |       |
| в клетках крови      |                  |       |             |         |       |       |
| Цитоплазматическая   | 1-2              | 1-2   | 1-2         | 2-3     | 2-3   | 2-3   |
| мембрана лимфоцитов  |                  |       |             |         |       |       |
| в костном мозге      |                  |       |             |         |       |       |
| Цитоплазматическая   | 2-2              | 2-2   | 3-2         | 3-3     | 3-3   | 3-3   |
| мембрана лимфоцитов  |                  |       |             |         |       |       |
| в лимфатическом узле |                  |       |             |         |       |       |
| Цитоплазматическая   | 2-2              | 2-2   | 2-2         | 3-2     | 3-2   | 3-2   |
| мембрана лимфоцитов  |                  |       |             |         |       |       |
| селезенки            |                  |       |             |         |       |       |
| Цитоплазматическая   | 1-1              | 2-3   | 0-0         | 2-2     | 3-3   | 1-1   |
| мембрана лимфоцитов  |                  |       |             |         |       |       |

| тимуса |  |  |  |  |
|--------|--|--|--|--|
|--------|--|--|--|--|

а. положительная интенсивность – процентная доля специфического окрашивания. 0, отсутствие окрашенных клеток; 1, минимальное или недостоверное окрашивание; 2, слабое положительное окрашивание; 3, умеренное положительное окрашивание. 0, отсутствие окрашенных клеток; 1, <25% клеток окрашены; 2, 25-50% клеток окрашены; 3, 50%-75% клеток окрашены.

# Пример 8 Отбор и функциональная верификация специфичных в отношении CD20 CAR (для получения биспецифичных в отношении CD20/19 CAR)

Перед конструированием биспецифичных в отношении CD20/CD19 CAR авторы изобретения провели обширные исследования для отбора и сужения специфичных в отношении CD 20 кандидатов scFV. На фиг. 7 показаны структуры шестнадцати специфичных в отношении CD20 CAR с шестью различными scFV и различными шарнирными/TM/сигнальными доменами. Полноразмерные ДНК синтезировали и клонировали для достижения конструкции кодирующих плазмид, и авторы изобретения тестировали противоопухолевые активности этих CAR с различными экспрессирующими CD20 клетками-мишенями.

На фиг. 8A показаны результаты анализа высвобождения IFNγ для отбора CAR-T20.1, CAR-T20.5, CAR-T20.6, CAR-T20.7, CAR-T20.8, CAR-T20.9 и CAR-T20.10, и среди этих CAR-T только CAR-T20.9 (Leu16) и CAR-T20.10 (Leu16) демонстрировали более высокое положительное высвобождение IFNγ.

На фиг. 8В показаны результаты анализа высвобождения IFN для отбора CAR-T20.1, CAR-T20.9, CAR-T20.10, CAR-T20.11, CAR-T20.12, CAR-T20.13, CAR-T20.14, CAR-T20.15 и CAR-T20.16. Среди этих CAR-T CAR-T20.10 (Leu16) и CAR-T20.14 (ОF) демонстрировали более высокое положительное высвобождение IFN у.

На фиг. 8С показаны результаты анализа высвобождения IFN для отбора CAR-T20.9, CAR-T20.12, CAR-T20.14, CAR-T20.17, CAR-T20.18, и CAR-T20.19. Среди этих CAR-T CAR-T20.14 (OF) и CAR-T20.19 (OF) демонстрировали более высокое положительное высвобождение IFN у.

На фиг. 9А показаны результаты для клеток CAR-T20.17 (Leu16 3<sup>e</sup> поколение), CAR-T20.18 (Leu16 2<sup>e</sup> поколение), CAR-T20.19 (OF 2<sup>e</sup> поколение), тестированных в отношении цитотоксичности при помощи анализа высвобождения LDH. Клеткимишени представляют собой положительные в отношении CD20 линии клеток Raji и

Ramos, и отрицательные в отношении CD20 Molt4. Все три CD20 CAR-Т-клетки могут вызывать апоптоз и высвобождение LDH в CD20-положительных опухолевых клетках, что указывает на то, что CAR-T20.17, CAR-T20.18, и CAR-T20.19 обладают сильными уничтожающими действиями в отношении клеток мишеней CD20-положительных клеток Raji и Romas.

На фиг. 9В показано ингибирование *in vivo* опухолевого роста в исследованиях на мышах NSG. Опухолевые клетки, инъецированные животным, представляют собой Raji, экспрессирующие люциферазу. В этом эксперименте опухолевые клетки Raji инъецировали и выращивали в мышах в течение одной недели, и затем эффекторные Т-клетки инжектировали через хвостовую вену, И затем интенсивность флуоресценции для мышей (при помощи визуализации флуоресценции IVIS) и массу мышей регистрировали каждые 7 суток. Этот эксперимент останавливали на 21е сутки, и статистические результаты анализировали. Эти результаты демонстрируют то, что клетки CAR-T20.19 (OF) обеспечивают лучшее ингибирование в отношении опухолевого роста, чем клетки CAR-T20.17 (Leu16) и CAR-T201.8 (Leu16) после 14 суток.

В заключение, путем большого количества экспериментов и сравнения обнаружили то, что 20.1, 20.2, 20.4, 20.5, 20.6, 20.7, 20.8 и 20.15 были в целом дефектны, а 20.11, 20.12 и 20.13 обладали некоторыми эффектами, но их эффекты были меньше, чем эффекты у 20.9, 20.10, 20.14, 20.16, 20.17, 20.18 и 20.19, где эффекты для 20.19(ОF) были наилучшими. На основе вышеприведенных структур CD20 scFv (OF) и CD19 scFv (FMC63) тандемно использовали в новом биспецифичном химерном антигенном рецепторе TN-OF-19 и рассматривали как наилучший кандидат для дополнительного анализа.

Аминокислотные последовательности специфичных в отношении CD20 CAR, вовлеченных в пример 7, представлены в таблице 2.

Таблица 2 Химерные антигенные рецепторы и их последовательности

| CAR-T | Последовательность                                 | SEQ |
|-------|--|-----|
|       |  | ID  |
|       |  | NO: |
| CAR-T | MDIQLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSLSFMHWYQQKPGSSPKPWIY  | 23  |
| 20.1  | ATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFG |     |
|       | AGTKLEISSGGGGGGGGGGGDVMGVDSGGGLVQPGGSRKLSCAAPGFT   |     |

|       | FSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRFTISRDNPKN   |    |
|-------|---|----|
|       | TLFLQMKLPSLCYGLLGPRDHVHRLLKTRLSNSIMYFSHFVPVFLPAKP   |    |
|       | TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA  |    |
|       | PLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC   |    |
|       | SCRFPEEEEGGCELEFRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY    |    |
|       | DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE     |    |
|       | RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR                   |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSL  | 24 |
| 20.5  | SFMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVE   |    |
|       | AEDAASYFCHQWSSNPLTFGAGTKLEIGGGGSGGGGGGGGGDVMGV      |    |
|       | DSGGGLVQPGGSRKLSCAAPGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISS    |    |
|       | PSSTLHYADRVKGRFTISRDNPKNTLFLQMKLPSLCYGLLGPRDHVHRL   |    |
|       | LTRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI |    |
|       | WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED   |    |
|       | GCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNDLQGSCRS                  |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPDVMGVDSGGGLVQPGGSRKLSCAAPGF    | 25 |
| 20.6  | TFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRFTISRDNPK   |    |
|       | NTLFLQMKLPSLCYGLLGPRDHVHRLLGGGGSGGGGGGGGGGDIQLTQ    |    |
|       | SPAILSASPGEKVTMTCRASSSLSFMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLAS   |    |
|       | GVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFGAGTKLEI  |    |
|       | TRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  |    |
|       | WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED   |    |
|       | GCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNDLQGSCRS                  |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV  | 26 |
| 20.7  | SYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEA  |    |
|       | EDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGGGGGGQVQLQ      |    |
|       | QPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIY     |    |
|       | PGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARST    |    |
|       | YYGGDWYFNVWGAGTTVTVSATRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA   |    |
|       | CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRGR   |    |
|       | KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNDL  |    |
|       | QGSCRS  |    |
|       | L   |    |

| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASG     | 27 |
|-------|---|----|
| 20.8  | YTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTAD     |    |
|       | KSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS     |    |
|       | AGGGGGGGGGGGGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIH      |    |
|       | WFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA   |    |
|       | ATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKTRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE |    |
|       | ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRG   |    |
|       | RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTND  |    |
|       | LQGSCRS   |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY    | 28 |
| 20.9  | TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK     |    |
|       | SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS    |    |
|       | GGGGSGGGGGGGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD       |    |
|       | WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA   |    |
|       | ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP  |    |
|       | PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR    |    |
|       | EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG   |    |
|       | QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN   |    |
|       | YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ    |    |
|       | KSLSLSLGKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY    |    |
|       | MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPV    |    |
|       | QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN    |    |
|       | LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS     |    |
|       | EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR            |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY    | 29 |
| 20.10 | TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK     |    |
|       | SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS    |    |
|       | GGGGSGGGGGGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD        |    |
|       | WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA   |    |
|       | ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP  |    |
|       | PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR    |    |
|       | EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG   |    |
|       | QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN   |    |

|       | YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |    |
|-------|--|----|
|       | KSLSLSLGKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY   |    |
|       | MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPV   |    |
|       | QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN   |    |
|       | LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS    |    |
|       | EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR           |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV | 30 |
| 20.11 | NYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVE  |    |
|       | AEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGGGGGSEVQL     |    |
|       | QQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAI    |    |
|       | YPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARS   |    |
|       | NYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP  |    |
|       | PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR   |    |
|       | EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG  |    |
|       | QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  |    |
|       | YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |    |
|       | KSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR   |    |
|       | PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE   |    |
|       | LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA    |    |
|       | YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR         |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY   | 31 |
| 20.12 | TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK    |    |
|       | SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS   |    |
|       | GGGGSGGGGGGGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD      |    |
|       | WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA  |    |
|       | ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP |    |
|       | PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR   |    |
|       | EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG  |    |
|       | QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  |    |
|       | YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |    |
|       | KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR |    |
|       | PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE   |    |
|       |  |    |

|       | LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA           |    |
|-------|---|----|
|       | YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR                |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY          | 32 |
| 20.13 | AFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADK           |    |
|       | STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSSGG           |    |
|       | GGSGGGGGGGDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITY           |    |
|       | LYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE         |    |
|       | DVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP         |    |
|       | SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN          |    |
|       | AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK          |    |
|       | TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES         |    |
|       | NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA          |    |
|       | LHNHYTQKSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI        |    |
|       | FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG          |    |
|       | QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ           |    |
|       | KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL            |    |
|       | PPR   |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT         | 33 |
| 20.14 | FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA           |    |
|       | KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS            |    |
|       | SGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA           |    |
|       | WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA        |    |
|       | VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP        |    |
|       | KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR           |    |
|       | ${\tt EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG}$ |    |
|       | QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN         |    |
|       | YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ          |    |
|       | KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR        |    |
|       | PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE          |    |
|       | LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA           |    |
|       | YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR                |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPGDVMGVDSGGGLVQPGGSRKLSCAAP           | 34 |
| 20.15 | GFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRFTISRDN         |    |
| 20.15 | GFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRFTISRDN         | _  |

|       | PKNTLFLQMKLPSLCYGLLGPRDHVHRLLKGGGGSGGGGGGGGDIQ      |    |
|-------|---|----|
|       | LTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSLSFMHWYQQKPGSSPKPWIYATSN   |    |
|       | LASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFGAGT   |    |
|       | KLEIESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD |    |
|       | VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD     |    |
|       | WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN   |    |
|       | QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL   |    |
|       | TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKIYIWAPLAGTC    |    |
|       | GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  |    |
|       | GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD     |    |
|       | PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL     |    |
|       | YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR                             |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASG     | 35 |
| 20.16 | YTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTAD     |    |
|       | KSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS     |    |
|       | AGGGGSGGGGGGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIH       |    |
|       | WFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA   |    |
|       | ATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP  |    |
|       | PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR    |    |
|       | EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG   |    |
|       | QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN   |    |
|       | YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ    |    |
|       | KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR  |    |
|       | PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE    |    |
|       | LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA     |    |
|       | YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR          |    |
| CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY    | 36 |
| 20.17 | TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK     |    |
|       | SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS    |    |
|       | GGGGGGGGGGGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD        |    |
|       | WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA   |    |
|       | ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP  |    |
|       | PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR    |    |

| QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  CAR-T 20.18 TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG   |       | EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG  |    |
|--|-------|--|----|
| KSLSLSLGKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY 37 TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 38 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGSGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ |       | QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  |    |
| MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY 20.18 TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |    |
| QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVIMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 38 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | KSLSLGKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY     |    |
| LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY 20.18 TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGGGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMINSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWSNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPV   |    |
| EIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY 20.18 TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNQQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 38 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWSNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN   |    |
| CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS    |    |
| 20.18 TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGGGGGGGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR           |    |
| SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS GGGGSGGGGGGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   | CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGY   | 37 |
| GGGGSGGGGGGGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  | 20.18 | TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK    |    |
| WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | SSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS   |    |
| ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 38 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | GGGGSGGGGGGGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD      |    |
| PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 38 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | WYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA  |    |
| EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG  QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR  PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE  LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRKNPQEGLYNELQKDKMAEA  YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T  MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT  20.19  FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA  KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS  SGGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA  WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA  VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP  KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR  EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG  QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP |    |
| QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 38 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR   |    |
| YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 38 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG  |    |
| KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  |    |
| PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |    |
| LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 38  FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | KSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR   |    |
| YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE   |    |
| CAR-T MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA    |    |
| 20.19 FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY                    |    |
| KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGGGGGGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  | CAR-T | MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT  | 38 |
| SGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   | 20.19 | FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA    |    |
| WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | KKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS     |    |
| VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | SGGGGGGGGGGGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA     |    |
| KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA |    |
| EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP |    |
| QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  |       | KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR    |    |
| YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |       | EEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG  |    |
|  |       | QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  |    |
| KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR   |       | YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ   |    |
|  |       | KSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR |    |

| PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE |  |
|--|--|
| LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA  |  |
| YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR       |  |
|  |  |

# Пример 9 Клиническое исследование фазы I TN-OF-19 CAR-Т-клеток

фазы Ι проводили Исследование на пациентах, страдающих рецидивирующей/трудно поддающейся лечению неходжкинской лимфомы (R/R NHL), для оценки безопасности и эффективности C-CAR039 (т.е. TN-OF-19 CAR-Tклетки, NCT04317885). После афереза для сбора Т-клеток готовили и инфузировали C-CAR039 в виде разовой внутривенной дозы после стандартной 3-суточной кондиционирующей схемы с циклофосфамидом/флударабином. C-CAR039 готовили в бессывороточной полуавтоматической и цифровой закрытой системе с медианным временем от вены к вене ("vein to vein time"), составляющим 18 суток. Уровень успешности изготовления составлял 100%. З Августа 2020 года 16 пациентов подвергали внутривенной инфузии C-CAR039 в диапазоне доз от  $1.0 \times 10^6$  до  $5.0 \times 10^6$ CAR-Т-клеток/кг. Для 14 пациентов данные по безопасности регистрировали в течение по меньшей мере одного месяца и для 13 пациентов (11 пациентов с DLBCL, 2 пациента с FL (фолликулярная лимфома)) регистрировали данные по эффективности в течение одного месяца или дольше.

Ключевые критерии отбора включали: (1) возраст 18-75 лет; (2) г/г В-NHL, включая DLBCL, FL (фолликулярная лимфома), MCL (мантийноклеточная лимфома); (3) заболевание, положительное в отношении CD19 или CD20; (4) отсутствие предшествующего лечения антителами против CD19; и (5) отсутствие активного вовлечения CNS (центральной нервной системы). Оценка безопасности включала частоту и тяжесть возникающих в процессе лечения побочных явлений (CTCAE V5,0). Оценка эффективности включала классификацию Лугано 2014: ORR; DOR; PFS; OS.

После прекращения сбора данных 31 января 2021 года 30 пациентов были распределены по четырем клиническим центрам; 28 пациентам была введена доза; Медианное время от вены к вене составляло 19 суток. Для 25 пациентов регистрировали данные в течение 1 месяца; для 17 пациентов регистрировали данные в течение 3 месяцев; для 12 пациентов регистрировали данные в течение 6 месяцев. 1 подвергшийся инфузии пациент не имеет поддающейся оценке активность

заболевания на момент включения в исследование.

Исходные демографические и клинические характеристики пациентов перед началом проводимого авторами изобретения лечения биспецифичными CAR представлены в таблице 3.

Медианный возраст пациентов, которым вводили дозу, составлял 54 года (диапазон: 28–71 год). Медианное количество предшествующих линий терапии составляло 3 (диапазон: 1-5 предшествующих линий терапии). У 5 (20%) пациентов была предшествующая аутологическая трансплантация стволовых кдеток (ASCT).

Таблица 3 Обобщение базовых клинических характеристик пациентов

| Характеристика             | N=25       |
|----------------------------|------------|
| Медианный возраст, лет     | 54 (28-71) |
| (диапазон)                 |            |
| • Bозраст ≥ 65, n (%)      | 8 (32,0)   |
| Мужчины/Женщины, n         | 18/7       |
| NHL подтип, n (%)          |            |
| • DLBCL                    | 12 (88,0)  |
| • PMBCL                    | 1 (4,0)    |
| • FL                       | 1 (4,0)    |
| • tFL                      | 1 (4,0)    |
|                            |            |
|                            |            |
| ECOG PS, n (%)             |            |
| • 0                        | 15 (60,0)  |
| • 1                        | 10 (40,0)  |
|                            |            |
|                            |            |
| IPI оценка 3/4, n (%)      | 6 (24,0)   |
| Ann Arbor стадия III / IV, | 19 (76,0)  |
| n (%)                      |            |

| Характеристика                                   | N=25        |
|--|-------------|
| Медианное количеств                              | 30          |
| предшествующих линий терапии,                    | n3 (1-5)    |
| (диапазон)                                       | 1 (4,0)     |
| •1, n (%)  | 9 (36,0)    |
| •2, n (%)  | 3 (12,0)    |
| •3, n (%)  | 7 (28,0)    |
| •4, n (%)  | 5 (20,0)    |
| •5, n (%)  |             |
| Предшествующая ASCT, n (%)                       | 5 (20,0)    |
| Самый хороший ответ в виде PD н                  | на 14       |
| последнее предшествующее лечение,                | n(56,0)     |
| (%)  |             |
| Получавшие промежуточное лечение,                | n5 (20,0)   |
| (%)  |             |
| Медианная инфузируемая доза, ×10 <sup>6</sup> /г | кг2,5 (1,0- |
| (диапазон)                                       | 5,0)        |

На фиг. 10 представлена структура и блок-схема исследования CAR039 r/r NHL. В частности, пациентов обследовали в течение 21 суток перед исследованием

(D-21). Отобранных субъектов включали в исследование и собирали лейкоциты периферической крови использовали для получения CAR-T-клеток. За -5 (D-5), -4 (D-4) и -3 (D-3) суток перед инфузией CAR-T пациенты получали лимфодеплецирующее предварительное лечение, включающее флударабин (30 мг/м²/сутки внутривенно, один раз в сутки в течение трех суток), и циклофосфамид (300 мг/м²/сутки, внутривенно, один раз в сутки в течение трех суток). Приблизительно через 72 часа после лимфодеплеции пациентам вводили 1,0 х 106, 2,5 х 106 или 5,0 х 106 CAR-T-клеток/кг массы тела на 0 сутки (D0) в виде разовой инфузии. Наблюдение за пациентами осуществляли на 4 сутки, 7 сутки, 10 сутки, 2 неделю, 3 неделю, 4 неделю, 8 неделю, 12 неделю, 6 месяц, 9 месяц и 12 месяц после инфузии. Первую клиническую оценку ответа проводили через 4 недели после инфузии CAR-T.

Регистрировали неблагоприятные реакции у пациентов (возникающие в процессе лечения неблагоприятные явления, TEAE) (таблица 4). Был только 1 (4%) синдром высвобождения цитокинов (CRS) степени 3 или более высокой степени. Нейротоксичность обнаружили только у двух пациентов (8,0%), причем отсутствовала нейротоксичность степени 3 или более высокой степени. Цитопения, такая как нейтропения и тромбоцитопения, в основном была связана с лимфодеплецией флударабином/циклофосфамидом (Cy/Flu). Цитопения также была обратимой Вышеизложенное показало, что биспецифичные CAR обладают превосходным профилем безопасности.

Таблица 4 Обобщение возникающих при лечении побочных явлений (АЕ)

| AE* (≥25%)      | Любая степень | Степень ≥3 (N=25) |
|-----------------|---------------|-------------------|
| n (%)           | (N=25)        |                   |
| Нейтропения     | 25 (100)      | 22 (88,0)         |
| Тромбоцитопения | 13 (52,0)     | 4 (16,0)          |
| Анемия          | 24 (96,0)     | 8 (40,0)          |
| Инфекция        | 13 (52,0)     | 0 (0)             |

<sup>\*</sup> CTCAE V5.0.

Таблица 5 Профиль безопасности

| Любая степень | Степень ≥3   |  |
|---------------|--|--|
| (N=25)        | (N=25)   |  |
| 24 (96,0)     | 1 (4)  |  |
| 3 (0-10)      |  |  |
|               |  |  |
| 4 (1-25)      |  |  |
|               |  |  |
| 4 (16,0)      |  |  |
| 2 (8,0)       |  |  |
| 2 (8,0)       | 0 (0)  |  |
| 16 (4-28)     |  |  |
| н.д.          |  |  |
| 1 (4,0)       |  |  |
| 0             |  |  |
|               |  |  |
|               | (N=25) 24 (96,0) 3 (0-10) 4 (1-25) 4 (16,0) 2 (8,0) 2 (8,0) 16 (4-28) н.д. 1 (4,0) |  |

<sup>\*\*</sup> ASTCT Согласованная классификация синдрома высвобождения цитокинов и нейротоксичности, ассоциированной с иммунными эффекторными клетками 2019.

Таблица 6 CRS и нейротоксичность

| CRS и нейротоксичность      | Bce        | 1,0 млн   | 2,0/2,5 млн | 4,0/5,0 млн |
|-----------------------------|------------|-----------|-------------|-------------|
|                             | (N=25)     | на кг     | на кг       | на кг       |
|                             |            | (N=4)     | (N=14)      | (N=7)       |
| CRS, n (%)                  | 24 (96,0)  | 4 (100)   | 13 (92,9)   | 7 (100)     |
| • Степень 1/2/3/4/5, n      | 18/5/1/0/0 | 3/1/0/0/0 | 10/2/1/0/0  | 5/2/0/0/0   |
| • Медиана в сутках до       | 3 (0-10)   | 7 (2-10)  | 4 (1-10)    | 1 (0-9)     |
| начала, сутки (диапазон)    |            |           |             |             |
| • Медиана в сутках до       | 4 (1-25)   | 2,5 (1-7) | 4 (1-25)    | 6 (1-15)    |
| регрессии, суток (диапазон) |            |           |             |             |
| • Лечение                   | 1 (4,0)    | 0 (0)     | 1 (7,1)     | 0 (0)       |
| сосудосуживающими           |            |           |             |             |
| средствами, %               |            |           |             |             |
| • Лечение                   | 4 (16,0)   | 0 (0)     | 2 (14,3)    | 2 (28,6)    |
| тоцилизумабом,%             |            |           |             |             |

| • Лечение стероидами, %        | 2 (8,0)   | 0 (0)     | 2 (14,3)  | 0 (0)     |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Нейротоксичность*, п (%)       | 2 (8,0)   | 0 (0)     | 0 (0)     | 2 (28,6)  |
| Степень 1/2/3/4/5, п           | 2/0/0/0/0 | 0/0/0/0/0 | 0/0/0/0/0 | 2/0/0/0/0 |
| Медиана в сутках до начала,    | 16 (4-28) | н.д.      | н.д.      |           |
| сутки (диапазон)               |           |           |           |           |
| Медиана в сутках до регрессии, | н.д.      | н.д.      | н.д.      | н.д.      |
| суток (диапазон)               |           |           |           |           |
| Лечение стероидами, %          | 1 (4,0)   | н.д.      | н.д.      | 1 (4,0)   |
| Направление в отделение        | 0         | 0         | 0         | 0         |
| интенсивной терапии, n (%)     |           |           |           |           |

<sup>\* 1</sup> пациент не достиг регрессии к дате прекращения сбора данных.

Лечение C-CAR039 хорошо переносилось при 1 CRS степени 3 у 25 пациентов и 2 нейротоксических событиях степени 1. Цитопении в основном были связаны со схемой подготовки (Cy/Flu лимфодеплеция) и были типичными и обратимыми.

После оценки в течение одного месяца 12/13 пациентов демонстрировали клиническое улучшение (общий уровень ответа или ORR=92%) и 11/11 пациентов с DLBCL отвечали на лечение (ORR=100%). Медиана последующего наблюдения составляла 70 суток (диапазон: 35-257 суток). Самый хороший общий ответ (BOR) включает 10 полных ответов (CR) и 2 частичных ответа (PR).

На фиг. 11 показано обобщение клинических результатов C-CAR039. Вводили три (3) дозы: (1)  $4,0x10^6$  или  $5,0x10^6$  /кг (N=7); (2)  $2,0x10^6$  или  $2,5x10^6$  /кг (N=14); и (3)  $1,0x10^6$  /кг (N=4).

После приблизительно 14 месяцев ORR составляла 92% (23 из 25 пациентов); CR составлял 84% (21 из 25 пациентов). Уровень CR через 6 месяцев составлял 82% (9 из 11 пациентов). Медиана последующего наблюдения (F/U) составляла 5,3 месяца (диапазон: 1,0 - 14,3 месяцев).

На фиг. 18 показана оценка Каплана-Мейера PFS для C-CAR039. 6-Месячное PFS составляет 87,31%, при 95% доверительными интервалами (CI) от 71,2 до 100,0. Медиана длительности ответа (DOR) не достигалась.

На фиг. 19 показан РК/PD профиль C-CAR039. Отсутствовали статистические различия в профилях РК между группами с различными дозами.

На фиг. 20 показан РК/PD профиль (распространение CAR-T и истощение Вклеток) в периферической крови пациентов с рецидивом. На фиг. 12 показаны примеры пациентов до и после лечения C-CAR039. Ясно продемонстрировано то, опухолевые поражения значительно уменьшались в размере через три месяца после лечения CAR T.

## Пример 10 PK профиль C-CAR039

Пролиферация и распространение C-CAR039 в периферической крови положительно коррелировали с регрессом опухоли. Обнаружена положительная ранняя тенденция корреляции между AUC (0-28 сутки) и C<sub>max</sub> C-CAR039, и клиническим ответом.

На фиг. 13 показаны пролиферация и распространение C-CAR039 в крови пациента. Результаты продемонстрировали то, что клетки C-CAR008 эффективно распространялись после инъекции.

Таблица 7 демонстрирует экспрессию CD19/CD20 у пациентов с рецидивом.

Таблица 7 Экспрессия CD19/CD20, тестируемая в опухолевых тканях при помощи IHC

|            |        | До лечения      | Рецидив после лечения CCAR066 |
|------------|--------|-----------------|-------------------------------|
| Пациент    | (П-т.) | CD19(+) CD20(+) | CD19(+) CD20(+)               |
| No. 8      |        |                 |                               |
| П-т No. 21 |        | CD19(+) CD20(+) | CD19(-) CD20(+)               |

Таблица 8. Взаимосвязи РК профиля (AUC $_{0\sim28\mathrm{сутки}}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $T_{last}$ ), дозы CAR-T-клеток и клинических ответов

|           | Доза (10^6   | Самый  |                     |         |           |       |            |
|-----------|--------------|--------|---------------------|---------|-----------|-------|------------|
| ID        | СAR-Т/кг)    | лучший | AUC <sub>0~28</sub> |         |           |       | Наблюдение |
| субъекта  | ( THC 17 KI) | ответ  | сутки               | Cmax    | $T_{max}$ | Tlast | (сутки)    |
| П-т No. 8 | 3            | SD     | 7,530               | 708     | 10        | 60    | 60+        |
| П-т No.   | 3            |        |                     |         |           |       |            |
| 13        | 3            | CR     | 201,811             | 30,290  | 10        | 28    | 28+        |
| П-т No. 7 | 4            | UE     | 223,932             | 57,478  | 31        | 60    | 60+        |
| П-т No. 9 | 3            | PR     | 537,713             | 38,316  | 7         | 57    | 57+        |
| П-т No. 4 | 3            | PR     | 607,007             | 89,655  | 12        | 84    | 84+        |
| П-т No.   | 5            |        |                     |         |           |       |            |
| 12        |              | CR     | 727,947             | 83,494  | 8         | 28    | 28+        |
| П-т No. 2 | 2            | CR     | 747,101             | 114,041 | 14        | 187   | 187+       |

| П-т No. 3 | 2 | CR | 1,154,844 | 139,497 | 10 | 182 | 182+ |
|-----------|---|----|-----------|---------|----|-----|------|
| П-т No. 5 | 3 | CR | 1,673,877 | 183,427 | 8  | 85  | 85+  |
| П-т No. 6 | 3 | CR | 2,437,574 | 223,644 | 13 | 55  | 55+  |
| П-т No. 1 | 1 | CR | 2,580,272 | 259,462 | 14 | 104 | 257+ |
| П-т No.   | 2 |    |           |         |    |     |      |
| 10        |   | CR | 2,953,074 | 308,343 | 11 | 55  | 55+  |
| П-т No.   | 4 |    |           |         |    |     |      |
| 14        | 7 | CR | 3,143,662 | 302,300 | 14 | 28  | 28+  |
| П-т No.   | 5 |    |           |         |    |     |      |
| 11        | , | CR | 8,117,064 | 715,187 | 28 | 28  | 28+  |

Пролиферация и распространение C-CAR039 в периферической крови положительно коррелировала с регрессом опухоли. Была обнаружена положительная ранняя тенденция корреляции между C-CAR039 AUC (0-28 сутки) и  $C_{max}$  и клиническим ответом.

 Таблица 9 SCHOLAR-1: Исход трудно-поддающейся лечению DLBCL при

 не-CAR Т-клеточной терапии (объединенный ретроспективный анализ)

| Исход                                 | MDACC   | IA/MC  | LY,12   | CORAL   | Объединенный |
|---------------------------------------|---------|--------|---------|---------|--------------|
|                                       | (n=165) | (n=82) | (CCTG)  | (n=170) | (n=523)      |
|                                       |         |        | (n=106) |         |              |
| Частота ответа, %                     | 20      | 26     | 26      | 31      | 26           |
| • CR                                  | 7       | 7      | 2       | 15      | 7            |
| • PR                                  | 13      | 18     | 25      | 16      | 18           |
| Частота ответа                        |         |        |         |         |              |
| (категория), %                        |         |        |         |         |              |
| • Первичная трудно-                   | NR      | 25     | 27      | 10      | 20           |
| поддающаяся лечению                   |         |        |         |         |              |
| • Трудно-                             | 20      | 21     | 20      | 40      | 26           |
| поддающаяся лечению >                 |         |        |         |         |              |
| 2-й линии терапии                     |         |        |         |         |              |
| <ul> <li>Рецидив ≤ 12 мес.</li> </ul> | 19      | 35     | NR      | 39      | 34           |
| после ASCT                            |         |        |         |         |              |
| Медиана OS, мес.                      | 6,6     | 5,0    | 6,6     | 6,5     | 6,3          |

Crump. Blood. 2017; 130:1800.

Таблица 10 C-CAR039 в сравнении с имеющимися в продаже CART продуктами против CD19

|                            | ZUMA-      | JULIET[2]  | TRANSCEND        | C-CAR039   |
|----------------------------|------------|------------|------------------|------------|
|                            | 1[1]       | (n=111)    | NHL              | (n=25)     |
|                            | (n=101)    |            | 001[3] (n=269**) |            |
| Средний возраст, лет       | 58 (23-76) | 56 (22-76) | 63 (54–70)       | 54 (28-71) |
| (диапазон)                 |            |            |                  |            |
| DLBCL (включая HGBL),      | 76         | 79         | 64               | 88         |
| 0%                         |            |            |                  |            |
| ECOG 0/1, %                | 100        | 100        | 99               | 100        |
| ≥ 3 предшествующих         | 69         | 51         | 51               | 60         |
| лечений, %                 |            |            |                  |            |
| IPI 3/4, %                 | 48         | -          | -                | 24         |
| Ann Arbor стадия III/IV, % | 85         | 76         | -                | 76         |
| Предшествующая ASCT,       | 21         | 49         | 33               | 20         |
| %                          |            |            |                  |            |
| Самый хороший ответ в      | 66(PD)     | 55         | 75 (PD,SD,PR)    | 80         |
| виде PD или SD             |            |            |                  |            |
| непосредственно перед      |            |            |                  |            |
| лечением, %                |            |            |                  |            |
| ORR, %                     | 82 (Самый  | 52 (Самый  | 73 (Самый        | 92 (Самый  |
|                            | лучший)    | лучший)    | лучший)          | лучший)    |
| CR, %                      | 58 (Самый  | 40 (Самый  | 53 (Самый        | 84 (Самый  |
|                            | лучший)    | лучший)    | лучший)          | лучший)    |
| Степень ≥ 3 CRS/NE, %      | 13*/31†    | 22‡/12†    | 2†/10            | 4/0        |
| Использование              | 43/27      | 14/10      | 18/10            | 14/12      |
| тоцилизумаба/стероида,     |            |            |                  |            |
| 0%                         |            |            |                  |            |
|                            | l          | l          | I                | I .        |

<sup>\*\*256</sup> включены в выборку, подлежащую оценке эффективности. \*Per Lee scale. †Per CTCAE V4,03. ‡Per Penn Scale. §Per ASTCT).

<sup>1.</sup> Neelapu. NEJM. 2017; 377:2531. 2. Schuster. NEJM. 2019; 380:45. 3. Schuster. NEJM. 2019; 380:45

Таблица 11 C-CAR039 по сравнению с другими CD19/CD20 биспецифичными продуктами CAR-T

|                                    | Nirav N. Shah[1] | Tong C[2] | C-CAR039   |
|------------------------------------|------------------|-----------|------------|
|                                    | (n=22)           | (n=28)    | (n=25)     |
| Медианный возраст, лет (диапазон)  | 57 (38-72)       | ≥60 (25%) | 54 (28-71) |
| DLBCL (включая HGBL), %            | 50               | 57        | 88         |
| ECOG 0/1, %                        | 100              | 54        | 100        |
| ≥ 3 предшествующих лечений, %      | -                | 79        | 60         |
| Ann Arbor стадия III/IV, %         | -                | 82        | 76         |
| Предшествующая ASCT, %             | 37               | 18        | 20         |
| Самый хороший ответ в виде PD или  | 82               | 86        | 80         |
| SD непосредственно перед лечением, |                  |           |            |
| 0/0                                |                  |           |            |
| ORR (самый хороший), %             | 82               | 79        | 92         |
| СК (самый хороший), %              | 64               | 71        | 84         |
| Степень ≥ 3 CRS/NE, %              | 5/14             | 14/0      | 4/0        |
| Использование                      |                  | -         | 14/12      |
| тоцилизумаба/стероида, %           |                  |           |            |

C-CAR039 демонстрирует многообещающую эффективность и благоприятный профиль безопасности в клиническом исследовании у пациентов с г/г NHL. Эффективность выгодно отличается от терапии CAR-T против CD19.

## Пример 11 Клиническое исследования фазы I C-CAR066 (CAR-T20.19 (OF))

Рецидив вследствие утраты нацеленного на CD19 эпитопа представляет терапевтическую проблему лечения CAR-T против CD19. Исходы у этих пациентов повсюду были плохими. CD20 представляет собой проверенную терапевтическую мишень при В-клеточных неходжкинских лимфомах (B-NHL), которые лечат при помощи ранее одобренной и широко используемой терапии моноклональным антителом. C-CAR066 представляет собой новую терапию химерным антигенным рецептором Т (CAR-T) второго поколения. Доклинические исследования свидетельствуют о том, что C-CAR066 (полученный из scFV офтальмумаба) обладает превосходной противоопухолевой активностью по сравнению с CAR-T, полученными из scFV Leu16, ритуксумаба и обинутузумаба.

NCT04036019 представляет собой одноцентровое, нерандомизированное клиническое исследование фазы I с одной группой для оценки безопасности и эффективности C-CAR066 у субъектов, страдающих от г/г В-клеточной лимфомы, которых ранее лечили при помощи CAR-T против CD19. Первичная задача исследования заключается в оценке частоты и тяжести побочных явлений, возникающих при лечении. Вторичные задачи включают определение общей частоты ответа (ORR), PFS и OS. C-CAR039 готовили в бессывороточной полуавтоматической и цифровой закрытой системе. C-CAR066 вводят пациентам в виде разовой внутривенной дозы после стандартного 3-суточной кондиционирующей схемы с циклофосфамидом/флударабином.

На Фиг 14 показан дизайн исследования C-CAR066-NHL.

3 Августа 2020 года 7 пациентов (все с DLBCL) были включены в исследование и их подвергали инфузии C-CAR039 в диапазоне доз от 2,0 х 10<sup>6</sup> до 5,0 х 10<sup>6</sup> CAR-Т-клеток. Уровень успешности изготовления составлял 100%. Все пациенты продемонстрировали рецидив после лечения CAR-Т против CD19, только один из пациентов достиг CR после лечения CAR-Т против CD19.

Таблица 12 Клинические характеристики пациентов

| i                                       |                     |                    | Shanghai            | Tongji Hos           | pital                          |                           |                                    |
|---|---------------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Параметр                                | C006 C007 C010 C012 |                    | C013                | C014                 | C015                           |                           |                                    |
| Возраст                                 | 51                  | 41                 | 62                  | 60                   | 61                             | 49                        | 45                                 |
| Пол                                     | Мужской             | Мужской            | Женский             | Женский              | Мужской                        | Женский                   | Женский                            |
| Группа<br>дозирования                   | 3                   | 3                  | 2                   | 3                    | 3                              | 4.8                       | 3                                  |
| Tuπ NHL                                 | DLBCL               | DLBCL              | DLBCL               | DLBCL                | DLBCL                          | DLBCL                     | DLBCL                              |
| ECOG                                    | 1                   | 1                  | 1                   | 1                    | 1                              | 1                         | 1                                  |
| Stage                                   | IV B                | IIIA               | IIIA                | IVA                  | IIIA                           | UK                        | IV A                               |
| [P]                                     | UK                  | 2                  | UK                  | UK                   | UK                             | UK                        | 2                                  |
| Количество<br>предшествующих<br>раундов | 4                   | 5                  | 6                   | rð                   | 5                              | 4                         | 6                                  |
|   | 1.R-CHOP+3<br>PR    | 1.R-<br>CHOP+6 CR  | 1.R-CHOPE+2<br>SD   | 1.R-<br>CHOP*8<br>CR | 1.R-<br>CHOP+6<br>CR           | 1.R-<br>CHOP+6<br>+R+2 CR | 1.LEN+4<br>PR(FL)                  |
|   | 2.CHOP+1<br>PD      | 2. R-<br>MINE+2 PR | 2.R-DHAP*1<br>SD    | 2.ASCT*1<br>CR       | 2.Radiotion                    | 2.R2-<br>ICE+6 CR         | 2.R2-<br>EPOCH+3<br>PR (DLBC<br>L) |
|   | 3.ESHAP*1           | 3. L-ICE*1<br>SD   | 3.R-ESHAP*1<br>SD   | 3.CD19<br>CART CR    | 3.R-<br>ESHAP*2                | 3.CD19<br>CART PR         | 3.Hyper-<br>CVAD-B*1<br>PD         |
| Предшествующ<br>че лечения              | 4.R-<br>ESHAP*1 PR  | 4. CD19<br>CART SD | <b>4.</b> R-Gemox+1 |                      | <b>4</b> .R2-<br>ESHAP*1<br>PR | <b>4</b> .PD-1 SD         | 4.R2-<br>GEMOX+2<br>SD             |
|   | 5.ESHAP*1<br>PD     | 5. R2-ICE+1<br>PD  | 5.R2                |                      | 5.IR-<br>ESHAP*1<br>SD;        |                           | 5.CD19/22<br>CART SD               |
|   | 6.CD19<br>CART PR   |                    | 6.CD19 CART<br>SD   |                      | 6.CD19<br>CART SD              |                           | 6.R-<br>GEMOX*1<br>PD              |
|   | 7.Len+lbr+6<br>PD   |                    |                     |                      |                                |                           | 7.苯达莫司<br>汀*1 PD                   |
| Наилучший<br>ответ                      | PR                  | CR                 | SD                  | CR                   | CR                             | CR                        | PR                                 |
| Время CART-19                           | 20-Jan-19           | 11-Nov-19          | 7-Dec-19            | 17-Jul-19            | 30-Dec-19                      | 13-Jan-20                 | 12-Jun-19                          |
| Ответ на CART-<br>19                    | PR                  | SD                 | SD                  | CR                   | SD                             | PR                        | SD                                 |
| Исходный<br>диагноз                     | 31-Mar-18           | 31-Oct-18          | May-19              | Feb-18               | 8-Jun-16                       | Oct-15                    | 23-Feb-17                          |

Лечение C-CAR066 хорошо переносилось с обратимым уровнем 1~2 CRS у шести пациентов, уровнем 3 CRS у еще одного пациента и без явлений

нейротоксичности. 6/7 пациентов демонстрировали клиническое улучшение (уровень наилучшего общего ответа, ORR = 85,7%). Наилучший общий ответ включал 3 CR и 3PR. Все пациенты отвечали на лечение C-CAR066 и продемонстрировали различные степени опухолевого регресса (45-100%).

Таблица 13 Обобщение побочных действий, возникающих при лечении C-CAR066

| Параметр                           |            | Shanghai Teogji Hospital |            |            |            |            |            |  |  |
|------------------------------------|------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|--|
|                                    | C006       | C007                     | C010       | C012       | C013       | C014       | C015       |  |  |
| Синдром высвобождения<br>цитокинов | Степень 1  | Степень 3                | Степень 2  | Степень 1  | Степень 1  | Степень 1  | Степень 1  |  |  |
| Нейротоксичность                   | Отсутствие | Отсутствие               | Отсутствие | Отсутствие | Отсутствие | Отсутствие | Отсутствие |  |  |
| Нейтропения                        | Степень 3  | Степень 4                | Степень 4  | Степень 2  | Степень 3  | Степень 3  |            |  |  |
| Тромбоцитопения                    | Отсутствие | Степень 4                | Степень 4  | Степень 2  | Отсутствие | Степень 2  |            |  |  |
| Анемия                             | Степень 3  | Степень 3                | Степень 3  | Степень 1  | Степень 1  | Степень 2  |            |  |  |
| Инфекция                           | Отсутствие | Степень 2                | Отсутствие | Отсутствие | Отсутствие | Степень 2  |            |  |  |

6/7 пациентов демонстрировали клиническое улучшение (уровень наилучшего общего ответа, ORR = 85, 7%). Наилучший общий ответ включал 3 CR и 3PR. Все пациенты отвечали на лечение C-CAR066 и продемонстрировали разичные степени опухолевого регресса (45-100%).

Таблица 14 Обобщение клинической эффективности C-CAR066

| Параметр |                                  | Shangbai <u>Tongii</u> Hospital    |                           |                           |                                  |                           |                      |  |  |  |
|----------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------|--|--|--|
|          | C006                             | C007                               | C010                      | C012                      | C013                             | C014                      | C015                 |  |  |  |
| '4 нед.  | <b>PR</b><br>Уменьшенне<br>74.8% | <b>РК</b><br>Уменьшение<br>53.9%   | SD<br>Уменьшенне<br>40.7% | SD<br>Уменьшение<br>45.5% | <b>PR</b><br>Уменьшенне<br>51.6% | PR<br>Уменьшение<br>70.3% | PR<br>Уменьшенне 84% |  |  |  |
| 8 нед.   | PR<br>]Уменьшенне<br>77.2%       | <b>PR</b><br>Уменьшенне<br>73.3%   | SD<br>Уменьшенне<br>49.5% | SD                        | PR                               |                           |                      |  |  |  |
| 12 нед.  | РD (РЕТ-СТ)<br> новое поражение  | CR (РЕТ-СТ)<br>Уменьшенне<br>70.7% |                           |                           |                                  |                           |                      |  |  |  |

На фиг 15 показан пример PET-CT (позитронно-эмиссионной компьютерной томографии) для пациента до и после лечения C-CAR066.

С-CAR066 обладал благоприятным профилем безопасности и демонстрировал многообещающую раннюю эффективность у пациентов, страдающих от г/г NHL после лечения CAR-T против CD19. Продемонстрировано то, что C-CAR066 обладает

отличающимся механизмом действия по сравнению с лечением CAR-Т против CD-19. Нацеливание как на антиген CD20, так и на антиген CD19 может привести к превосходной клинической пользе по сравнению с нацеливанием только на CD19 или только на CD20 у пациентов, страдающих от В-клеточного лейкоза.

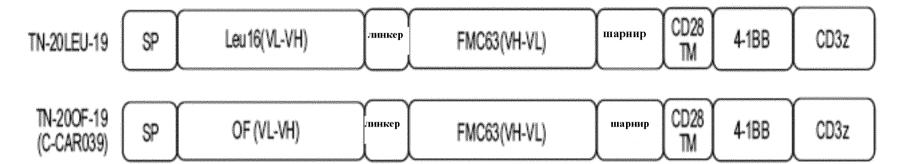
Объем настоящего изобретения не ограничен тем, что было, в частности, показано и описано ранее. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что существуют подходящие альтернативы приведенным примерам материалов, конфигураций, конструкций и измерений. Многочисленные ссылки, включая патенты и различные публикации, цитируются и обсуждаются в описании данного изобретения. Цитирование и обсуждение таких ссылок приведено только для чтобы раскрыть описание настоящего изобретения и не является подтверждением какая-либо того, что ссылка является известной предшествующего уровня техники относительно описанного здесь изобретения. Все ссылки, цитируемые и обсуждаемые в данном описании изобретения, полностью включены в данное описание изобретения. Изменения, модификации и другие реализации того, что описано здесь, будут очевидны специалистам в данной области техники без отступления от сущности и объема изобретения. Хотя некоторые воплощения настоящего изобретения были показаны и описаны, очевидно для специалистов в данной области техники, что эти изменения и модификации могут быть осуществлены без отступления от сущности и объема изобретения. Сведения, изложенные в предшествующем описании и прилагаемых графических материалах, представлены только в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

## Формула изобретения

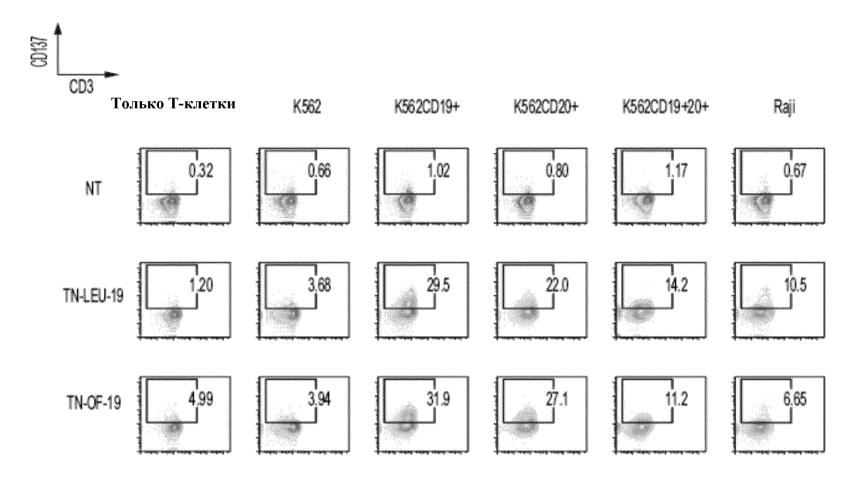
- 1. Биспецифичный химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:
- (1) антигенсвязывающую область против CD20, которая содержит вариабельную область легкой цепи (V<sub>L</sub>1) и вариабельную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>1), где V<sub>L</sub>1 содержит три области, определяющие комплементарность (CDR): CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, соответственно, и где V<sub>H</sub>1 содержит три CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, соответственно; и
- (2) антигенсвязывающую область против CD19, которая содержит вариабельную область легкой цепи (V<sub>L</sub>2) и вариабельную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>2), где V<sub>L</sub>2 содержит три области, определяющие комплементарность (CDR): CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 39, соответственно, и где V<sub>H</sub>2 содержит три CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, соответственно.
  - **2.** Биспецифичный CAR по п. 1, где V<sub>L</sub>1 расположен по N-концу V<sub>H</sub>1.
  - 3. Биспецифичный CAR по п. 1, где V<sub>H</sub>2 расположен по N-концу V<sub>L</sub>2.
- **4.** Биспецифичный CAR по п. 1, где  $V_{L1}$  и  $V_{H1}$  имеют аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 3, соответственно.
- **5.** Биспецифичный CAR по п. 1, где  $V_{L2}$  и  $V_{H2}$  имеют аминокислотные последовательности, которые на от приблизительно 80% до приблизительно 100% идентичны аминокислотным последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно.

- **6.** Биспецифичный CAR по п. 1, где антигенсвязывающая область против CD20 представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфично связывается с CD20, и где антигенсвязывающая область против CD19 представляет собой scFv, который специфично связывается с CD19.
- 7. Биспецифичный CAR по п. 1, дополнительно содержащий одно или более чем одно из следующего:
  - (а) сигнальный пептид,
  - (б) шарнирную область,
  - (в) трансмембранный домен,
  - (г) костимулирующую область, и
  - (д) цитоплазматический сигнальный домен.
- **8.** Биспецифичный CAR по п. 7, где костимулирующая область содержит костимулирующую область 4-1BB (CD137), CD28, OX40, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CD70, CD134, PD1, Dap10, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), NKG2D, GITR, TLR2 или их комбинации.
- **9.** Биспецифичный CAR по п. 7, где цитоплазматический сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3ζ.
- **10.** Биспецифичный CAR по п. 7, где шарнирная область содержит шарнирную область Ig4, CD8, CD28, CD137 или их комбинации.
- **11.** Биспецифичный CAR по п. 7, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD8, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 или их комбинации.
- **12.** Биспецифичный CAR по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность, которая на от приблизительно 80% до приблизительно 100% идентична аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO. 16.
  - **13.** Иммунная клетка, экспрессирующая биспецифичный CAR по п. 1.
- **14.** Иммунная клетка по п. 13, представляющая собой Т-клетку или клеткунатуральный киллер (NK).
  - **15.** Нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифичный CAR по п. 1.
  - **16.** Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 15.
- **17.** Способ лечения рака, включающий введение иммунной клетки по п. 13 субъекту, нуждающемуся в этом.
  - 18. Способ по п. 17, где рак представляет собой гематологический рак.

- **19.** Способ по п. 17, где рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.
- **20.** Способ по п. 17, где рак представляет собой лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лейкоз и/или множественную миелому.
- 21. Способ по п. 17, где рак представляет собой острый миелолейкоз (AML), множественную миелому (MM), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому (DLBCL) или их комбинации.
- **22.** Способ по п. 17, где иммунная клетка является аллогенной или аутологической.
- **23.** Способ лечения рака, включающий введение иммунной клетки по п. 13 субъекту, нуждающемуся в этом, где биспецифичный CAR генерирует площадь под кривой (AUC) в диапазоне от приблизительно 1e+06 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3,2e+06 копий/гДНК в крови субъекта приблизительно через 28 суток после введения.
- **24.** Способ лечения рака, включающий введение иммунной клетки по п. 13 субъекту, нуждающемуся в этом, где биспецифичный CAR генерирует максимальную концентрацию в плазме крови (C<sub>max</sub>) в диапазоне от приблизительно 1e+05 копий/мкг геномной ДНК (копий/гДНК) до приблизительно 3e+05 копий/гДНК в крови субъекта.
- **25.** Способ по п. 24, где биспецифичный CAR имеет  $T_{max}$  в диапазоне от приблизительно 8 суток до приблизительно 15 суток.
- **26.** Способ по п. 25, где биспецифичный CAR имеет  $T_{max}$  в диапазоне от приблизительно 10 суток до приблизительно 14 суток.

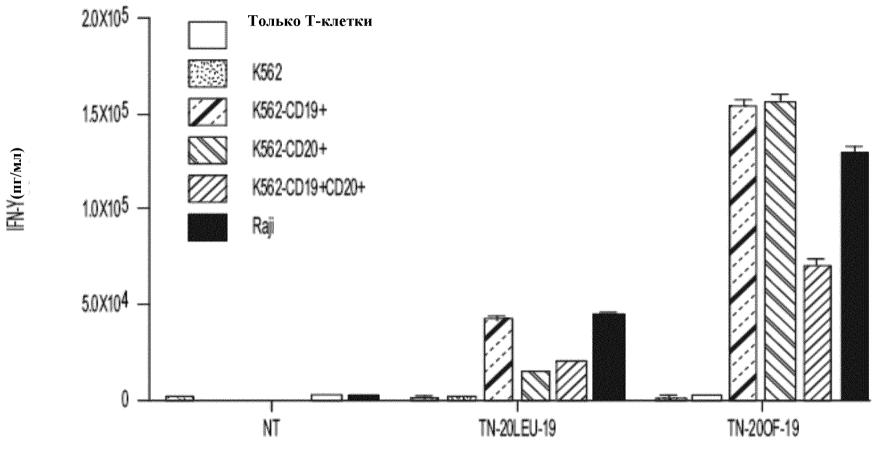


Фиг. 1

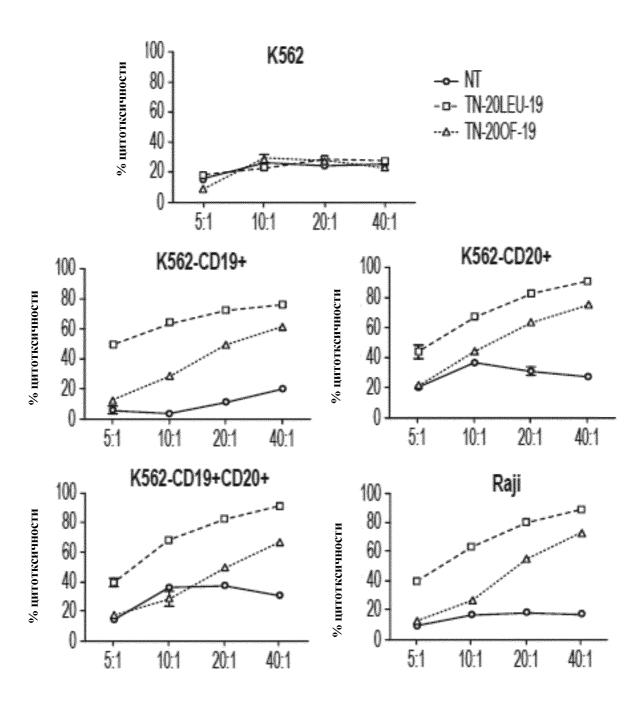


Фиг. 2А



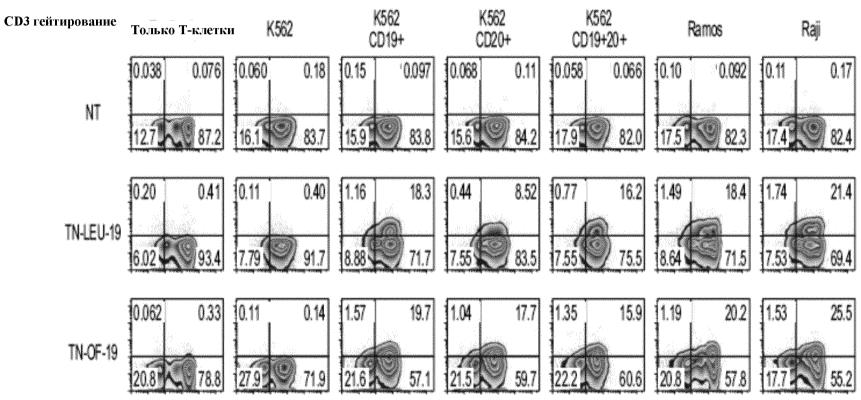


Фиг. 2В



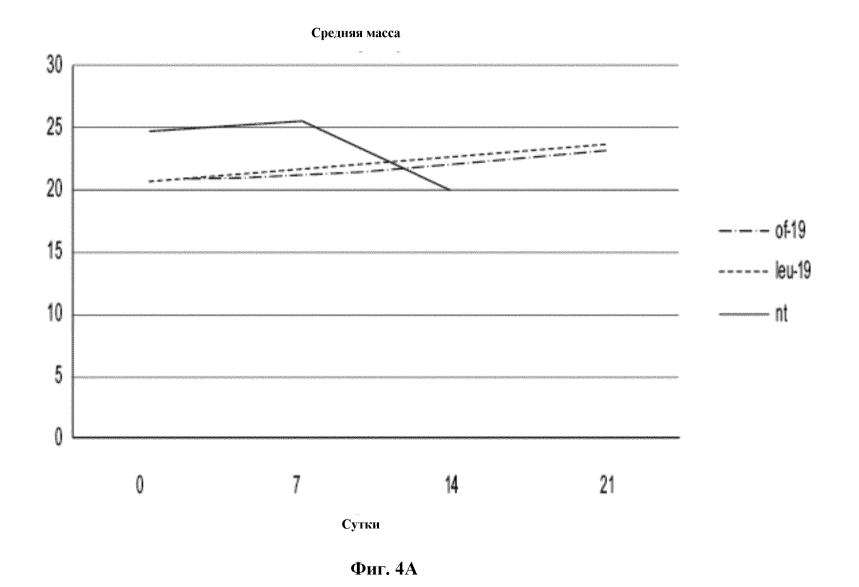
Фиг. 3А

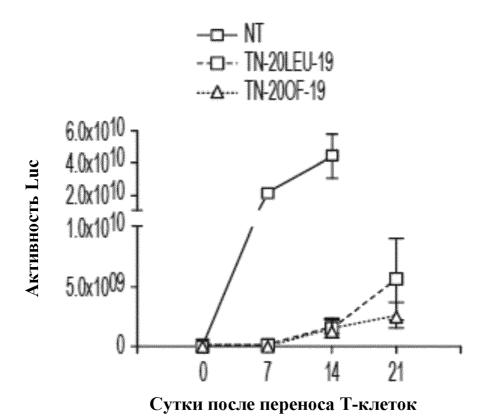




Фиг. 3В



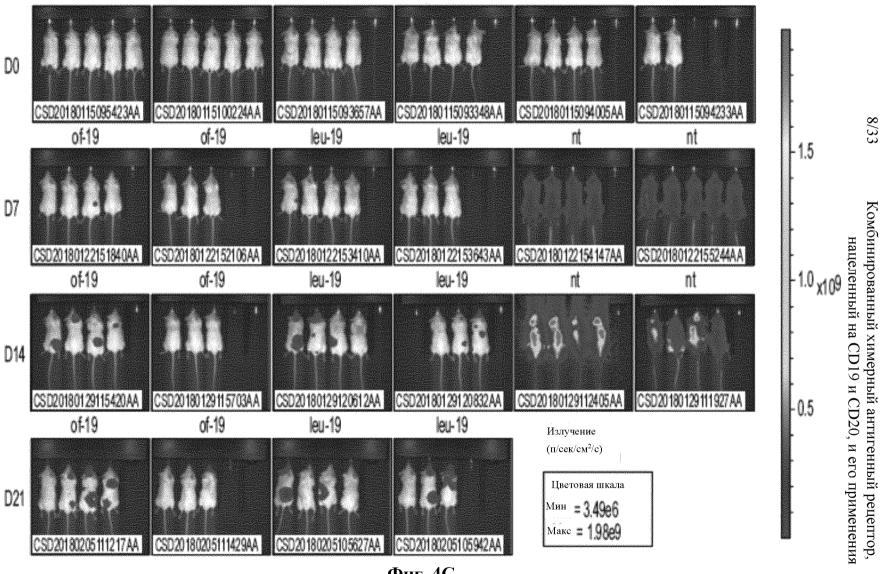




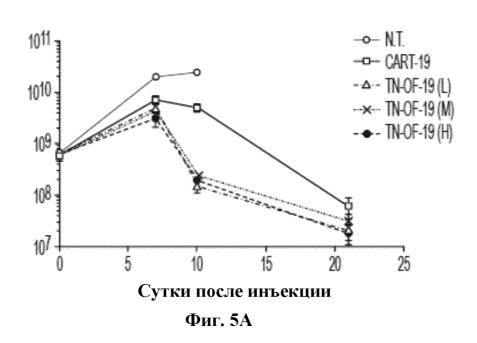
Исследование на мышах NSG

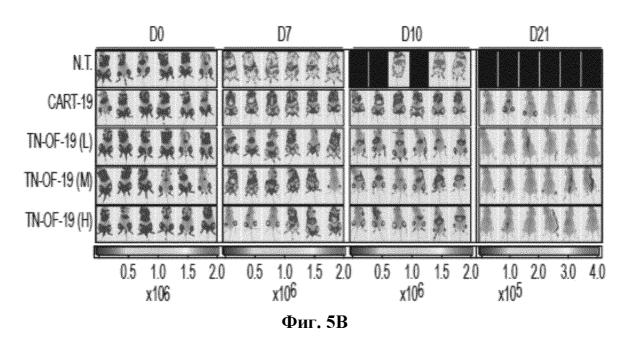
Фиг. 4В

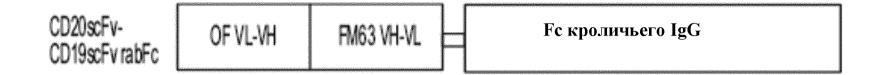
## Несгруппированные



Фиг. 4С

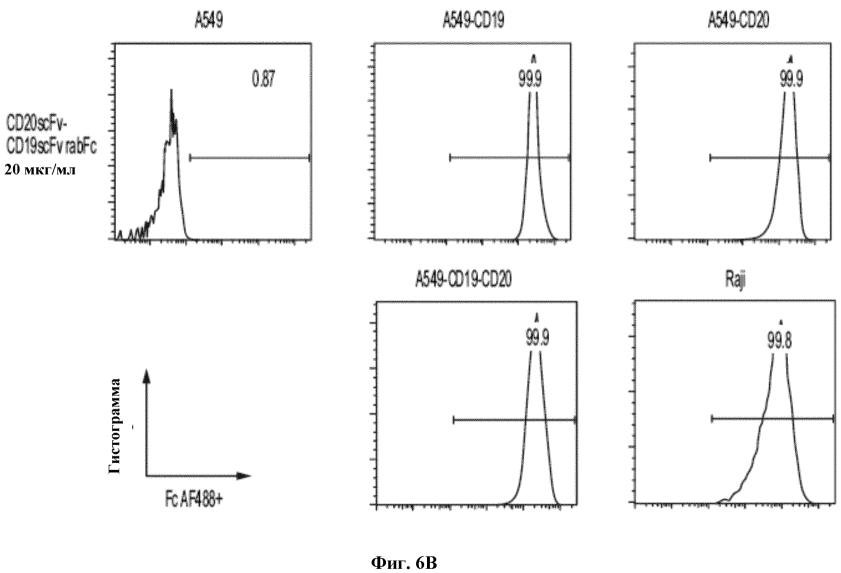






Фиг. 6А

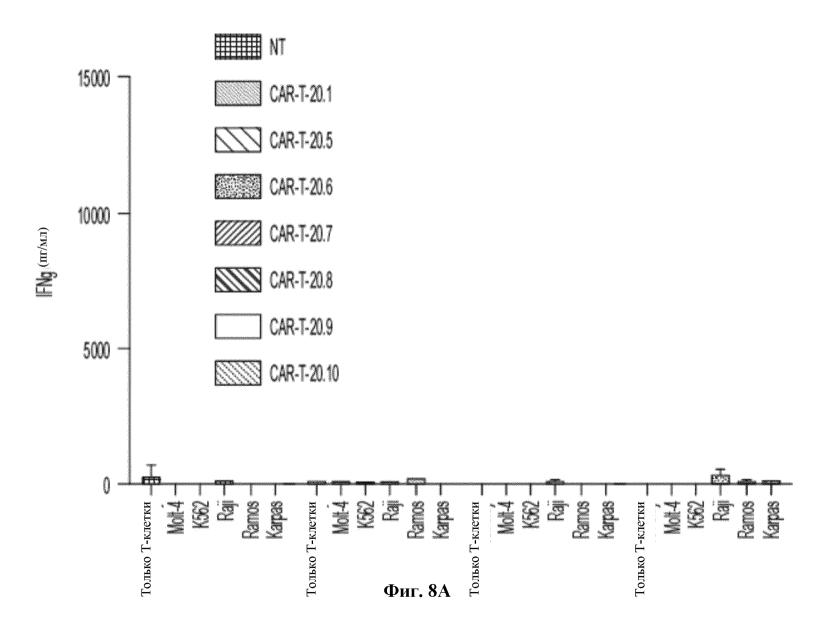




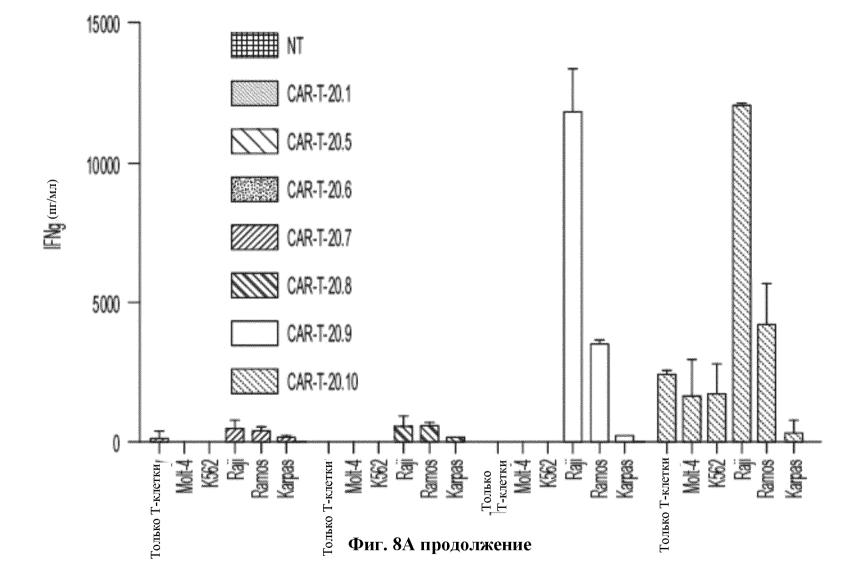
12/33 Комбинированный химерный антигенный рецептор, нацеленный на CD19 и CD20, и его применения

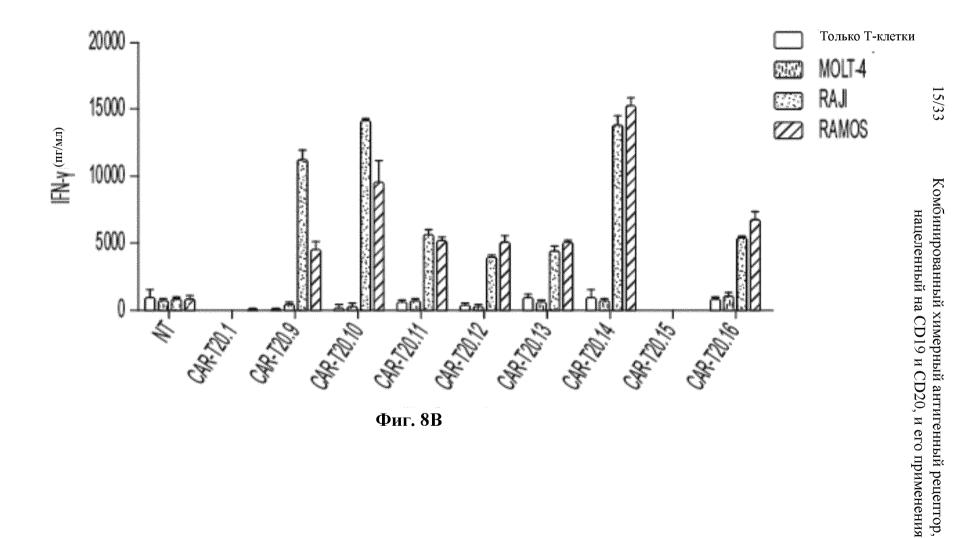
| CAR-T20.1  | AY160760 (VL-VH)                   | CD8 maphup CD8 TM 4-1BB CD3z        |
|------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| CAR-T20.5  | AY160760 (VL-VH)                   | CD8 maphifp CD8 TM 4-1BB CD3z       |
| CAR-T20.6  | AY160760 (VH-VL)                   | CD8 IIIIADHHID CD8 TM 4-1BB CD3z    |
| CAR-T20.7  | IDEC-C2B8 (VL-VH)                  | CD8 maphip CD8 TM 4-1BB CD3z        |
| CAR-T20.8  | IDEC-C2B8 (VH-VL                   | ) CD8 шарнир CD8 TM 4-1BB CD3z      |
| CAR-T20.9  | Leu16 (VH-VL) III DE LEU16 (VH-VL) | ** -CH2-CH3 CD28 TM CD28 4-1BB CD3z |
| CAR-T20.10 | Leu16 (VH-VL) OP Traper            | °-CH2-CH3 CD28 TM CD28 4-1BB CD3z   |
| CAR-T20.11 | Leu16 (VL-VH) пария                | P -CH2-CH3 CD8 TM 4-1BB CD3z        |
| CAR-T20.12 | Leu16 (VH-VL)                      | ™ -CH2-CH3 CD8 TM 4-1BB CD3z        |
| CAR-T20.13 | Обинутузумаб (VH-VL) шарин         | P +CH2-CH3 CD8 TM 4-1BB CD3z        |
| CAR-T20.14 | Офатумумаб (VH-VL) шарні           | □ -CH2-CH3 CD8 TM 4-1BB CD3z        |
| CAR-T20.15 | AY160760 (VH-VL) [IIIAPHI          | P-CH2-CH3 CD8 TM 4-1BB CD3z         |
| CAR-T20.16 | Ритуксимаб (VH-VL) шарні           | ** -CH2-CH3 CD8 TM 4-1BB CD3z       |
| CAR-T20.17 | Leu16 (VH-VL) [шарн                | CH2-CH3 CD28 TM CD28 4-1BB CD3z     |
| CAR-T20.18 | Leu16 (VH-VL) (maphr               | CH2-CH3 CD8 TM 4-1BB CD3z           |
| CAR-T20.19 | Офатумумаб (VH-VL) шарии           | -012-013 CD8 IM 4-1BB CD32          |
|            |                                    | 235E N297Q                          |

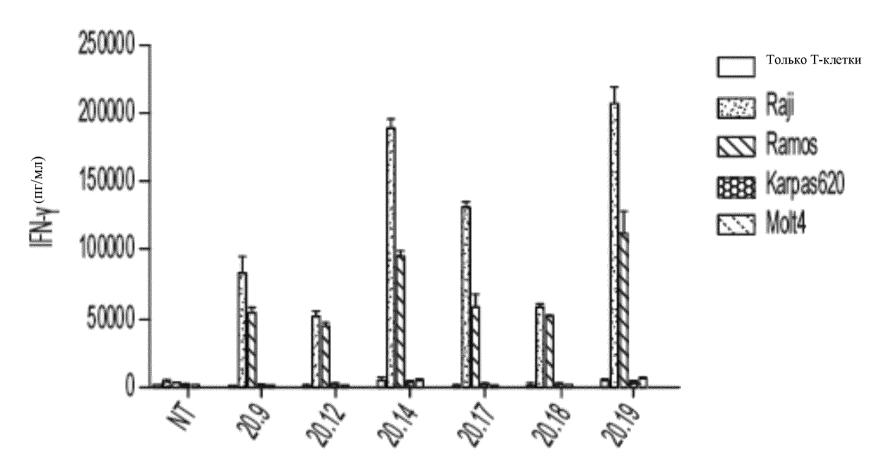
Фиг. 7



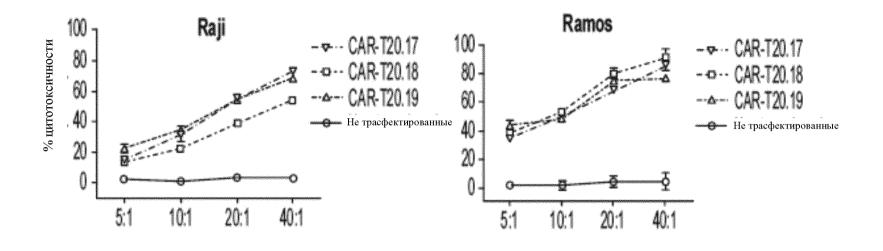


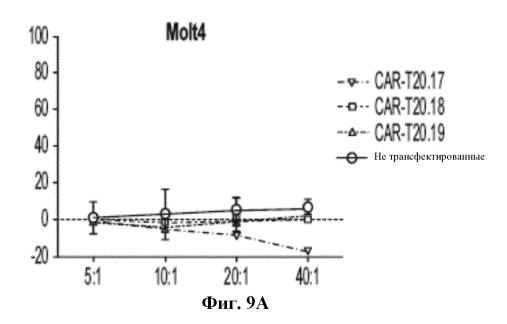


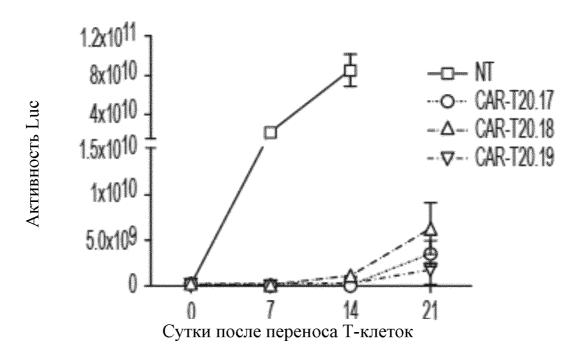




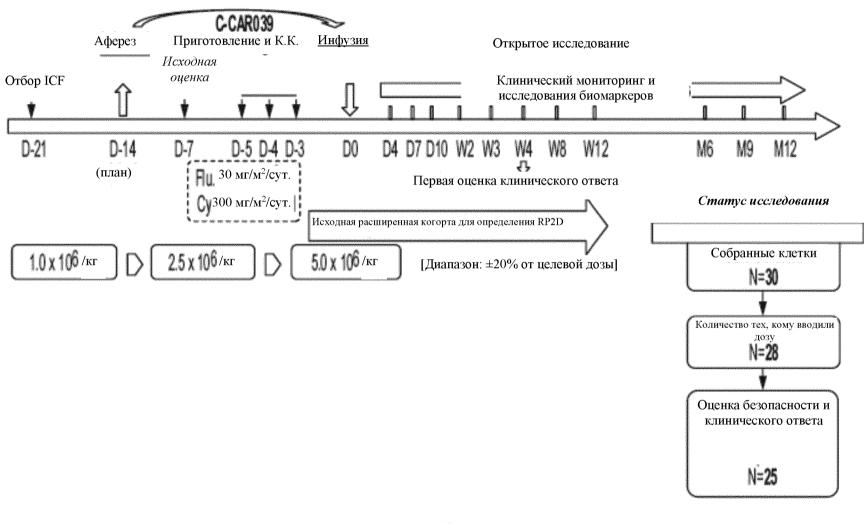
Фиг. 8С



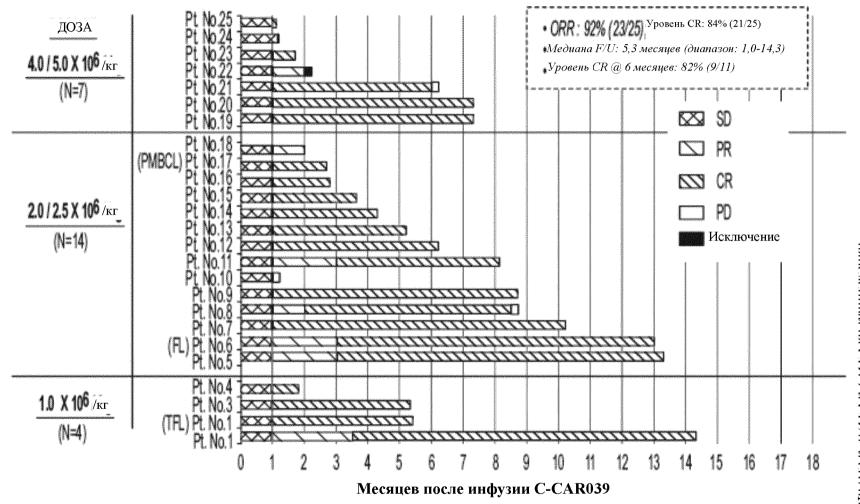




Фиг. 9В



Фиг. 10

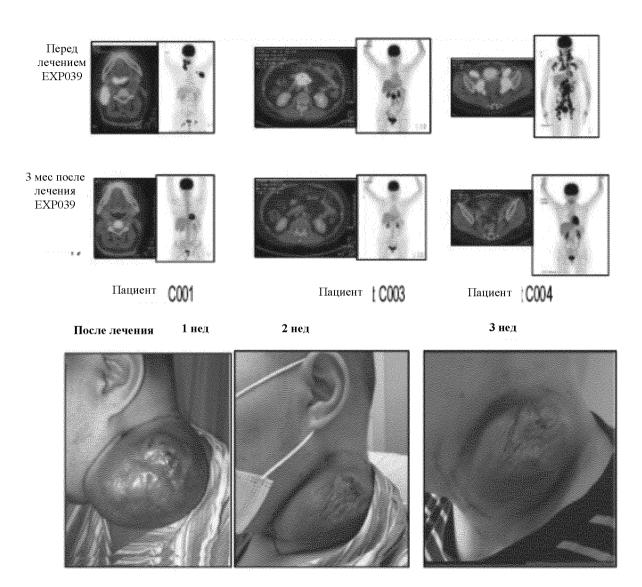


20/33

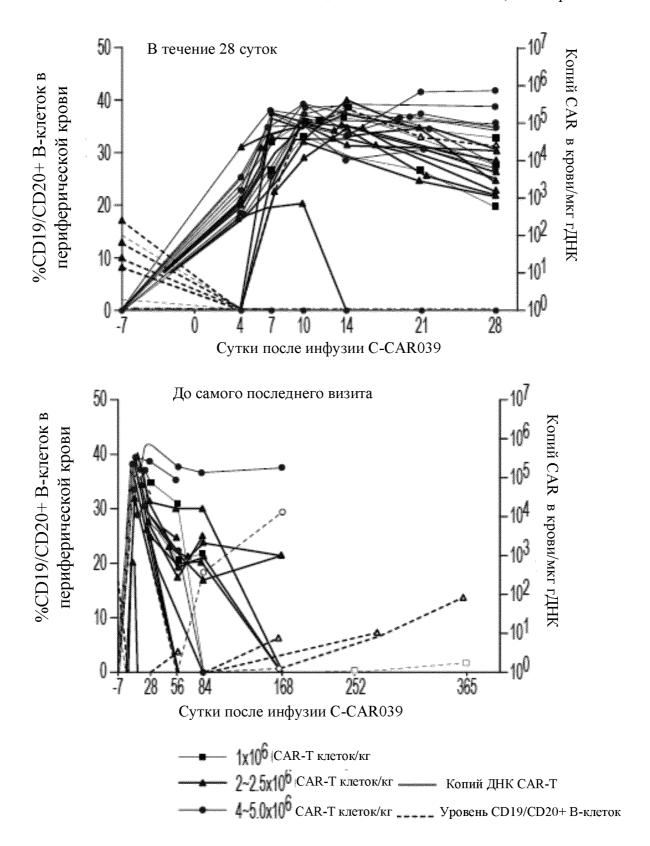
Комбинированный химерный антигенный рецептор,

Последняя дата учета данных: 31 января 2021, 20 пациентов оценивали в отношении эффективности. П-т 22 был исключен на 2 месяце в отношении SPM (AML)

Фиг. 11

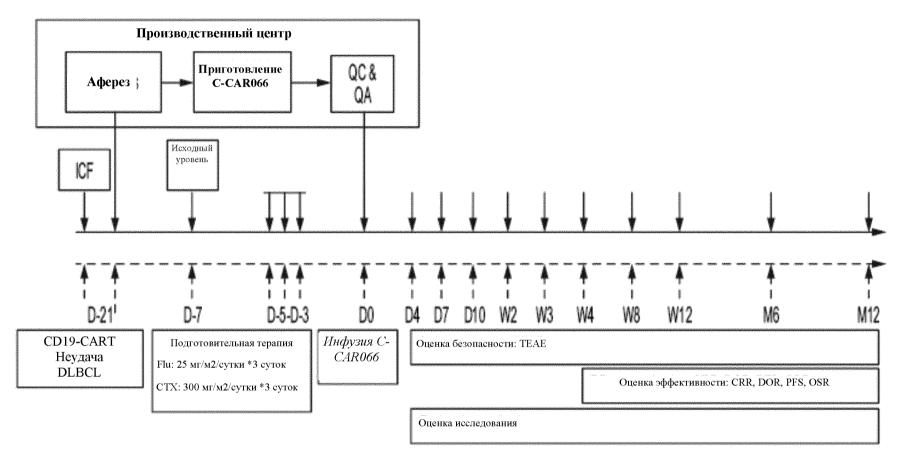


Фиг. 12



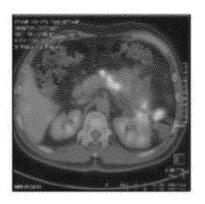
Фиг. 13

23/33



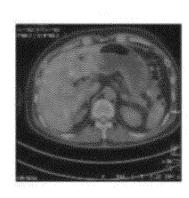
Фиг. 14



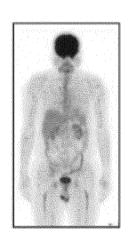




Перед CD20 CAR-Т лечением

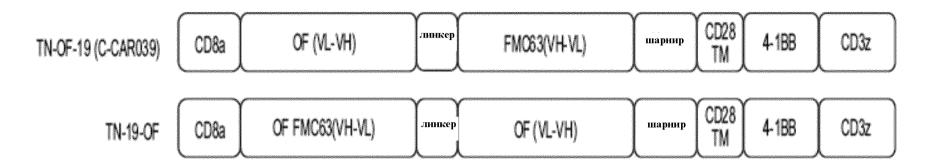




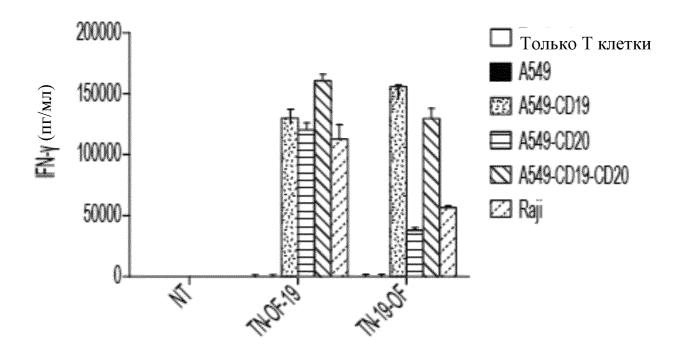


3 мес после CD20 CAR-Т лечения

Фиг. 15



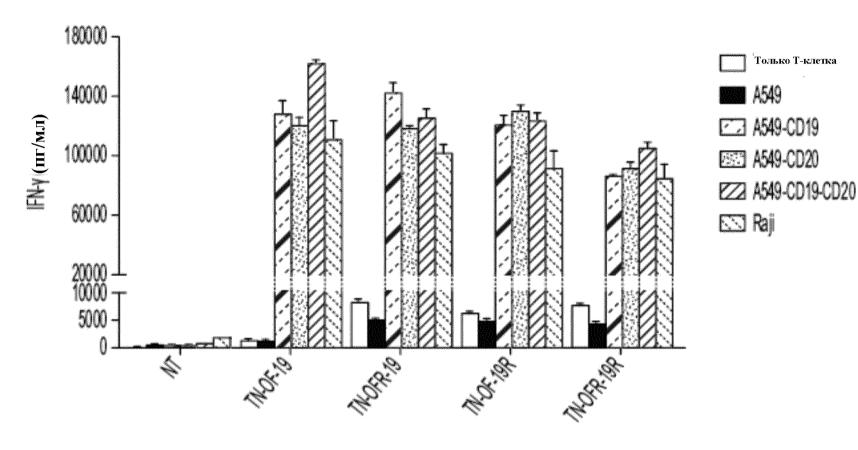
Фиг. 16А



Фиг. 16В

| TN-0F-19 (C-CAR039) | CD&a ] | OF (VL-VH) | линкер | FMC63(VH-VL) | шарнир | CD28TM | 4-188 | CD3z |
|---------------------|--------|------------|--------|--------------|--------|--------|-------|------|
| TN-OFR-19           | CD8a   | OF (VH-VL) | линкер | FMC63(VH-VL) | шарнир | CD28TM | 4-188 | CD3z |
| TN-OF-19R           | CD8a   | OF (VL-VH) | линкер | FMC63(VL-VH) | шарнир | CD28TM | 4-188 | CD3z |
| TN-OFR-19R          | CD8a   | OF (VH-VL) | линкер | FMC63(VL-VH) | шарнир | CD28TM | 4-188 | CD3z |

Фиг. 16С

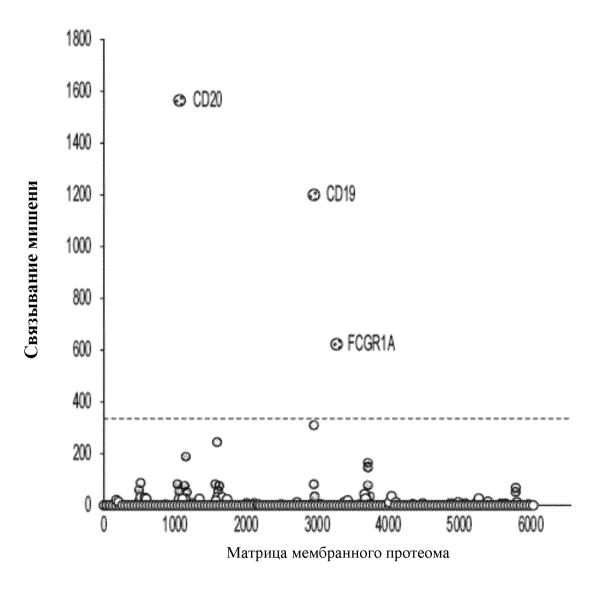


Фиг. 16D

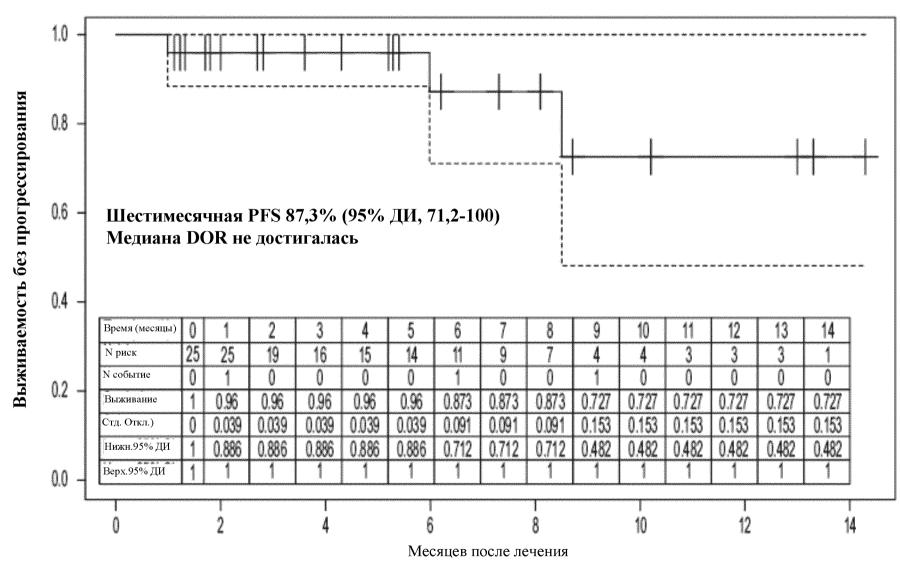


Валидация путем совместного культивирования первичных клеток или сверьэкспрессирующих антиген клеток с CAR-T клетками

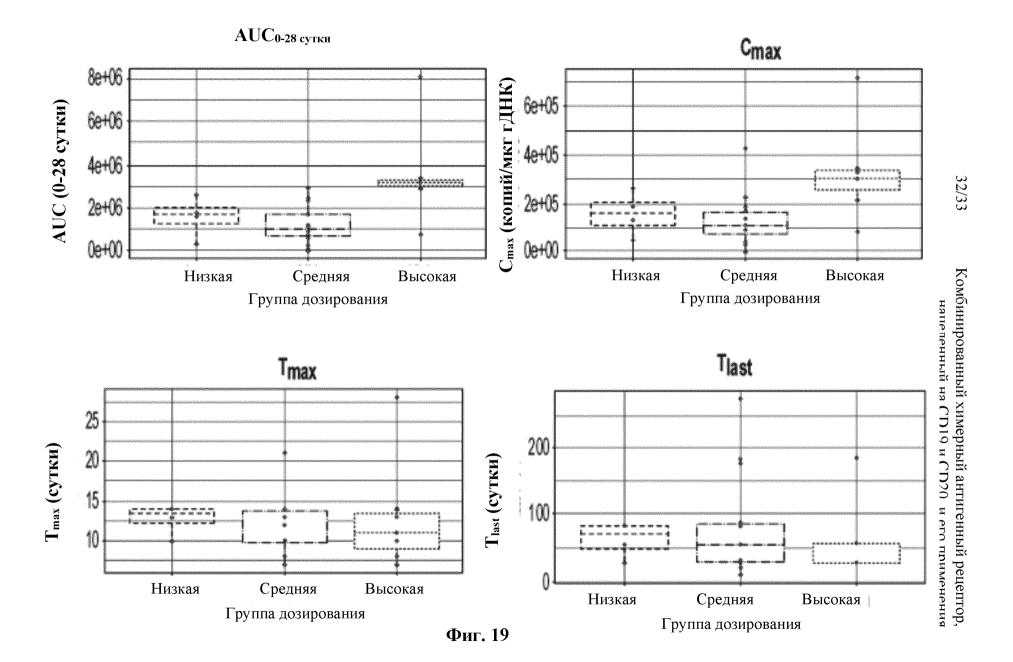
Фиг. 17А

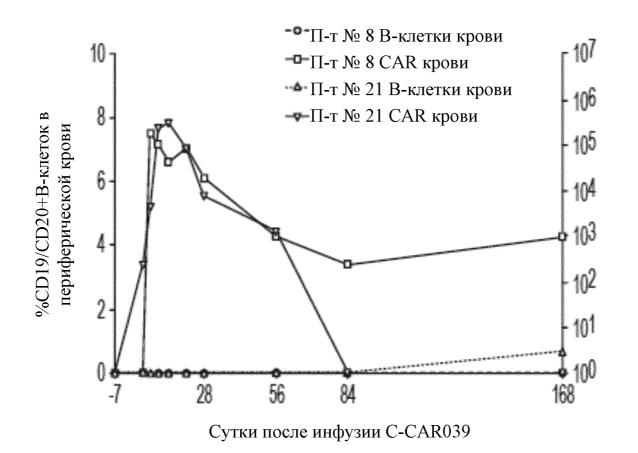


Фиг. 17В



Фиг. 18





Фиг. 20