(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292456 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.20

(22) Дата подачи заявки
2021.02.26

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР

(31) **62/982,665**
(32) **2020.02.27**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/019889**
(87) **WO 2021/173985 2021.09.02**
(88) **2021.10.21**

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Брогдон Дженнифер, Дранофф Гленн, Грин Майкл Р., Хэк Энниша, Кодраси Оля, Прейтико Элизабет Дороти, Прайс Эндрю, Стейн Эндрю Марк, Рэйо Эми, Янг Дженнифер, Гранда Брайан Вальтер (US), Бонданца Аттилио (CH), Энгельс Борис, Лим Хиунгвоок, Сохони Акаш, Тринор Луиз, Чжу Сюй, Гимарэс Карла, Джэйэшенкар Шиамали, Коши Сандип Тхариан (US), Сиб Режи (CH), Бардрофф Михель, Миллер Сандра (DE)

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

(57) В настоящем изобретении предусмотрены способы получения иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), а также композиции, полученные посредством таких способов.

202292456 A1

202292456 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575333EA/042

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США 62/982665, поданной 27 ноября 2020 года, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 25 февраля 2021 года, имеет название N2067-7170WO_SL.txt, и ее размер составляет 653029 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится в общем к способам получения иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток), сконструированных таким образом, чтобы они экспрессировали химерный антигенный рецептор (CAR), и композициям, содержащим их.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Терапия на основе адоптивного переноса клеток (ACT) с использованием Т-клеток, в особенности Т-клеток, трансдуцированных с помощью химерных антигенных рецепторов (CAR), показала перспективность в нескольких исследованиях в отношении гематологического рака. Изготовление генетически модифицированных Т-клеток в настоящее время является сложным процессом. Существует потребность в способах и процессах для улучшения получения терапевтического продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, повышения качества продукта и доведения до максимума терапевтической эффективности продукта.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам получения иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток), сконструированных таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, и композиций, полученных с применением таких способов. Также раскрыты способы применения таких композиций для лечения заболевания, например, рака, у субъекта.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR). Способ включает: (i) приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта лейкафереза) в контакт (например, связывание) с полиспецифической связывающей молекулой, содержащей (A) домен, связывающий CD3, и (B) домен, связывающий костимулирующую молекулу (например, домен, связывающий CD2, или домен, связывающий CD28); (ii)

приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей CAR, за счет чего обеспечивается получение популяции клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и (iii) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторного составления популяции клеток в среде для криоконсервации) или введения, где: (a) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и стадию (iii) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 22, 23, 24 или 25 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (i); (b) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и стадию (iii) проводят не позже чем через 30, 36 или 48 часов после начала стадии (ii), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 часов после начала стадии (ii); или (c) популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в вирусном векторе, например, вирусном векторе, выбранном из лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в невирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в плазмиде. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) не находится в каком-либо векторе. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает трансдукцию популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая связывающая молекула, содержащая (A) домен, связывающий CD3, и (B) домен, связывающий костимулирующую молекулу (например, домен, связывающий CD2, или домен, связывающий CD28).

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, расположен с N-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, например, Fab для CD2 или Fab для CD28; или домен, связывающий CD3,

например, scFv для CD3, расположен с С-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, например, Fab для CD2 или Fab для CD28, где необязательно между доменом, связывающим CD3, и доменом, связывающим костимулирующую молекулу, расположена Fc-область; или полиспецифическая связывающая молекула содержит CH2, и домен, связывающий CD3, расположен с N-концевой стороны от CH2.

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов, представленных в данном документе, полиспецифическая связывающая молекула содержит (i) первый полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VH домена, связывающего CD3, VL домена, связывающего CD3, VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, CH2 и CH3; и (ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит (i) первый полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, CH2, CH3, VH домена, связывающего CD3, и VL домена, связывающего CD3; и (ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит (i) первый полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, VH домена, связывающего CD3, VL домена, связывающего CD3, CH2 и CH3; и (ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит scFv, и домен, связывающий костимулирующую молекулу, является частью Fab-фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит: (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, из молекулы антитела к CD3 из таблицы 27 (например, антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2), антитела к CD3 (3) или антитела к CD3 (4)); и/или (ii) аминокислотную последовательность любой из VH- и/или VL-областей молекулы антитела к CD3, представленной в таблице 27 (например, антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2), антитела к CD3 (3) или антитела к CD3 (4)), или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, представляет собой антигенсвязывающий домен для CD2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD2 содержит: (i) VH, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и VL, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, из молекулы антитела к CD2 из таблицы 27 (например, антитела к CD2 (1)); и/или (ii) аминокислотную последовательность любой из VH- и/или VL-областей молекулы

антитела к CD2, представленной в таблице 27 (например, антитела к CD2 (1)), или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, представляет собой антигенсвязывающий домен для CD28. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD28 содержит: (i) VH, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и VL, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, из молекулы антитела к CD28 из таблицы 27 (например, антитела к CD28 (1) или антитела к CD28 (2)); и/или (ii) аминокислотную последовательность любой из VH- и/или VL-областей молекулы антитела к CD28, представленной в таблице 27 (например, антитела к CD28 (1) или антитела к CD28 (2)), или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH, связанную с VL с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера $(G_4S)_4$. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, где VH расположена с N-концевой стороны от VL.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, является частью Fab-фрагмента, например, Fab-фрагмента, который является частью полипептидной последовательности, содержащей Fc-домен, где необязательно Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 28, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, расположен с N-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, связан с доменом, связывающим костимулирующую молекулу, с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера (G4S)4.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, расположен с C-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, где необязательно между доменом, связывающим CD3, и доменом, связывающим костимулирующую молекулу, расположена Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит CH1. В некоторых вариантах осуществления CH1 расположен с C-концевой стороны от VH домена, связывающего костимулирующую молекулу.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит один или оба из CH2 и CH3.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, связан с CH3 с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера (G4S)4. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, расположен с C-концевой стороны от CH1. В некоторых вариантах осуществления конструкция

содержит CH2, и домен, связывающий CD3, расположен с N-концевой стороны от CH2. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, связан с CH1 с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера (G4S)2. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, связан с CH2 с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера (G4S)4.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит CL. В некоторых вариантах осуществления CL расположен с C-концевой стороны от VL домена, связывающего костимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления CL-домен связан с CH1, например, посредством дисульфидного мостика.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит (i) аминокислотную последовательность любой тяжелой цепи, представленной в таблице 28, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; и/или (ii) аминокислотную последовательность любой легкой цепи, представленной в таблице 28, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описан способ получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), при этом способ включает: (i) приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта лейкафереза) в контакт (например, связывание) с (A) средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или (B) средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток; (ii) приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей CAR, за счет чего обеспечивается получение популяции клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и (iii) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторного составления популяции клеток в среде для криоконсервации) или введения, где: (a) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и стадию (iii) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 22, 23, 24 или 25 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (i); (b) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и стадию (iii) проводят не позже чем через 30, 36 или 48 часов после начала стадии (ii), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 часов после начала стадии (ii);

или (c) популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в вирусном векторе, например, вирусном векторе, выбранном из лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в невирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в плазмиде. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) не находится в каком-либо векторе. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает трансдукцию популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) дополнительно включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с shRNA, которая целенаправленно воздействует на Tet2, содержащей (A) смысловую нить, содержащую последовательность-мишень Tet2, и (B) антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично, или вектором, кодирующим shRNA. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит последовательность-мишень Tet2 GGGTAAGCCAAGAAAGAAA (SEQ ID NO: 418). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит последовательность, обратно комплементарную ей, т. е. TTTCTTTCTTGGCTTACCC (SEQ ID NO: 419). В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий shRNA, является таким же, как вектор, кодирующий CAR, или отличается от него. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий последовательность shRNA, содержит промотор (такой как, без ограничения, промотор U6), смысловую нить, содержащую последовательность-мишень Tet2, петлю, антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично, и необязательно поли(Т)-хвост, например, последовательности из **таблицы 29.** В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) проводят вместе со стадией (i). В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) проводят не позже чем через 20 часов после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) проводят не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) проводят не позже чем через 18 часов после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) проводят не позже чем через 22, 23, 24 или 25 часов после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) проводят не позже чем через 24 часа после начала

стадии (i). В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) проводят не позже чем через 30, 36 или 48 часов после начала стадии (ii). В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) проводят не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 часов после начала стадии (ii).

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) является размножившейся с увеличением численности на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i).

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой средство, которое стимулирует CD3. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28, ICOS, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD226 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, выбрано из антитела (например, однодоменного антитела (например, антитела из одного вариабельного домена тяжелой цепи), пептитела, Fab-фрагмента или scFv), малой молекулы или лиганда (например, существующего в природе, рекомбинантного или химерного лиганда). В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, выбрано из антитела (например, однодоменного антитела (например, антитела из одного вариабельного домена тяжелой цепи), пептитела, Fab-фрагмента или scFv), малой молекулы или лиганда (например, существующего в природе, рекомбинантного или химерного лиганда). В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, не содержит гранулу. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, не содержит гранулу. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, содержит антитело к CD3. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит антитело к CD28. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, содержит антитело к CD3, ковалентно присоединенное к коллоидной полимерной наноматрице. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует CD3, содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов для CD3 или TCR, как,

например, без ограничения, антитело или фрагмент антитела к CD3 или к TCR, содержащие одну или несколько их CDR, тяжелых цепей и/или легких цепей - такие как, без ограничения, антитело к CD3 или к TCR, представленное в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит антитело к CD28, ковалентно присоединенное к коллоидной полимерной наноматрице. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RA, IL6RB или CD2. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов для CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RB и/или CD2, как, например, без ограничения, антитело или фрагмент антитела к CD28, к ICOS, к CD27, к CD25, к 4-1BB, к IL6RA, к IL6RB или к CD2, содержащие одну или несколько их CDR, тяжелых цепей и/или легких цепей - такие как, без ограничения, антитело к CD28, к ICOS, к CD27, к CD25, к 4-1BB, к IL6RA, к IL6RB или к CD2, представленное в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержат TransAct^{TM} для Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержатся в полиспецифической связывающей молекуле. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит антигенсвязывающий домен для CD3 и антигенсвязывающий домен для CD28 или CD2. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические связывающие молекулы содержат одну или несколько тяжелых и/или легких цепей - таких как, без ограничения, тяжелые и/или легкие цепи, представленные в таблице 28. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело имеет конфигурацию согласно любой из схем, представленных на **фиг. 50А**. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело является одновалентным или двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область биспецифического антитела подвергнута сайленсингу. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит множество биспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител являются одновалентными. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител содержат Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область одного или нескольких из множества биспецифических антител подвергнута сайленсингу. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител

конъюгированы друг с другом в виде мультимера. В некоторых вариантах осуществления мультимер имеет конфигурацию согласно любой из схем, представленных на **фиг. 50B**.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, не содержит гидрогель. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, не содержит гидрогель. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, не содержит альгинат. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, не содержит альгинат.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, содержит гидрогель. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит гидрогель. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, содержит альгинат. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит альгинат. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит MagCloudz™ от Quad Technologies.

В некоторых вариантах осуществления стадия (i) обеспечивает увеличение процентной доли клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii), например, популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более высокую процентную долю клеток, экспрессирующих CAR (например, на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50 или 60% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа без стадии (i).

В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является такой же, как процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) отличается на не более чем 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12% от процентной доли необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) отличается на не более чем 5 или 10% от процентной доли необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (i).

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например,

необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (iii) является такой же, как процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (iii) отличается на не более чем 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12% от процентной доли центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (iii) отличается на не более чем 5 или 10% от процентной доли центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (i).

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более низкую процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти (например, на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40% ниже), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более низкую процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти (например, на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40% ниже), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции

клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является увеличенной по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является увеличенной по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней. В некоторых вариантах осуществления процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном

аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 75, 100 или 125%. В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 100, 150, 200, 250 или 300% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 100, 150, 200, 250 или 300% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней. В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150 или 200%. В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 50, 100, 125, 150 или 175% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 50, 100, 125, 150 или 175% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для клеток, полученных посредством в остальном

аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней. В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150, 200 или 250%. В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 50, 100 или 125% ниже), чем медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 50, 100 или 125% ниже), чем медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней. В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 125, 150, 175 или 200%. В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 40, 50, 60, 70 или 80% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 40, 50, 60, 70 или 80% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней. В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток из стадии (iii) является

приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 180, 190, 200 или 210%. В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 20, 30 или 40% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере 20, 30 или 40% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) после инкубирования с клеткой, экспрессирующей антиген, распознаваемый CAR, секретирует IL-2 на более высоком уровне (например, в по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 14 раз более высоком), чем клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней, например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 8 в отношении фиг. 29C-29D.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) после введения in vivo персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% более высоком) (например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 1 в отношении фиг. 4C) по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) после введения in vivo персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% более высоком) (например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 1 в отношении фиг. 4C) по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после

стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) после введения in vivo демонстрирует более сильную противоопухолевую активность (например, более сильную противоопухолевую активность при низкой дозе, например, дозе, составляющей не более $0,15\times10^6$, $0,2\times10^6$, $0,25\times10^6$ или $0,3\times10^6$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR), чем клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) является уменьшенной по сравнению с количеством живых клеток в популяции клеток в начале стадии (i), например, согласно оценке по количеству живых клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся за менее чем 0,5, 1, 1,5 или 2 часа, например, менее чем 1 или 1,5 часа, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i).

В некоторых вариантах осуществления стадии (i) и (ii) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra), ингибитор LSD1 или ингибитор MALT1. В некоторых вариантах осуществления стадии (i) и (ii) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-7, IL-21 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления стадии (i) и (ii) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-21, IL-7, IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra), ингибитор LSD1, ингибитор MALT1 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления стадию (i) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra), ингибитор LSD1 или ингибитор MALT1. В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra), ингибитор LSD1 или ингибитор

MALT1. В некоторых вариантах осуществления стадию (i) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-7, IL-21 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-7, IL-21 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления стадию (i) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-21, IL-7, IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra), ингибитор LSD1, ингибитор MALT1 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-21, IL-7, IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra), ингибитор LSD1, ингибитор MALT1 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления среда для клеток представляет собой бессывороточную среду, содержащую заменитель сыворотки. В некоторых вариантах осуществления заменитель сыворотки представляет собой заменитель сыворотки для иммунных клеток (ICSR) CTS™.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) (iv) получение свежего продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как свежий продукт, представляющий собой цельную кровь, свежий продукт, представляющий собой костный мозг, или свежий продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, свежий продукт, полученный в результате тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) (v) выделение популяции клеток (например, Т-клеток, например, CD8+ и/или CD4+ Т-клеток), приводимых в контакт на стадии (i), из свежего продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как свежий продукт, представляющий собой цельную кровь, свежий продукт, представляющий собой костный мозг, или свежий продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, свежий продукт, полученный в результате тимэктомии)). В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) проводят не позже чем через 35, 36 или 48 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 30, 36 или 48 часов после начала стадии (v). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в конце стадии (v).

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) получение криоконсервированных Т-клеток, выделенных из продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, как, например, криоконсервированных Т-клеток, выделенных из цельной крови, костного

мозга или продукта, полученного в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) (iv) получение криоконсервированного продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как криоконсервированный продукт, представляющий собой цельную кровь, криоконсервированный продукт, представляющий собой костный мозг, или криоконсервированный продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, криоконсервированный продукт, полученный в результате тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) (v) выделение популяции клеток (например, Т-клеток, например, CD8+ и/или CD4+ Т-клеток), приводимых в контакт на стадии (i), из криоконсервированного продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как криоконсервированный продукт, представляющий собой цельную кровь, криоконсервированный продукт, представляющий собой костный мозг, или криоконсервированный продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, криоконсервированный продукт, полученный в результате тимэктомии)). В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) проводят не позже чем через 35, 36 или 48 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 30, 36 или 38 часов после начала стадии (v). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в конце стадии (v).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описан способ получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), при этом способ включает: (1) приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного продукта лейкафереза) в контакт с цитокином, выбранным из IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-6 или их комбинации, (2) приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей CAR, за счет чего обеспечивается получение популяции клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и (3) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторного составления популяции клеток в среде для криоконсервации) или введения, где (a) стадию (2) проводят вместе со стадией (1) или не позже чем через 5 часов после начала стадии (1), например, не позже чем через 1, 2, 3, 4

или 5 часов после начала стадии (1), и стадию (3) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (1), например, не позже чем через 22, 23, 24 или 25 часов после начала стадии (1), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (1), или (b) популяция клеток из стадии (3) не является размножившейся или является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в вирусном векторе, например, вирусном векторе, выбранном из лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в невирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в плазмиде. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) не находится в каком-либо векторе. В некоторых вариантах осуществления стадия (2) включает приведение в контакт, необязательно трансдукцию, популяции клеток (например, Т-клеток) с вирусным вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления стадия (2) дополнительно включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с shRNA, которая целенаправленно воздействует на Tet2, содержащей (A) смысловую нить, содержащую последовательность-мишень Tet2, и (B) антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично, или вектором, кодирующим shRNA. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит последовательность-мишень Tet2 GGGTAAGCCAAGAAAGAAA (SEQ ID NO: 418). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит последовательность, обратно комплементарную ей, т. е. TTTCTTTCTTGGCTTACCC (SEQ ID NO: 419). В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий shRNA, является таким же, как вектор, кодирующий CAR, или отличается от него. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий последовательность shRNA, содержит промотор (такой как, без ограничения, промотор U6), смысловую нить, содержащую последовательность-мишень Tet2, петлю, антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично, и необязательно поли(Т)-хвост, например, последовательности из **таблицы 29**.

В некоторых вариантах осуществления стадию (2) проводят вместе со стадией (1). В некоторых вариантах осуществления стадию (2) проводят не позже чем через 5 часов после начала стадии (1). В некоторых вариантах осуществления стадию (2) проводят не позже чем через 1, 2, 3, 4 или 5 часов после начала стадии (1). В некоторых вариантах осуществления стадию (3) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (1). В некоторых вариантах осуществления стадию (3) проводят не позже чем через 22, 23, 24

или 25 часов после начала стадии (1). В некоторых вариантах осуществления стадию (3) проводят не позже чем через 24 часов после начала стадии (1).

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) не является размножившейся, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) является размножившейся с увеличением численности на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1).

В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-2. В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-7. В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-21. В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-2 и IL-7. В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-2 и IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-2 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-2 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-7 и IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-7 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-7 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-21. В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-21 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в

контакт с IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-21.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток среди клеток, экспрессирующих CAR (например, на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает приведение популяции клеток в контакт, например, с антителом к CD3.

В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (3) является такой же, как процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (3) отличается на не более чем 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12% от процентной доли необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (3) отличается на не более чем 5 или 10% от процентной доли необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (3) является увеличенной по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (3) увеличена на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (3) увеличена на по меньшей мере 10 или 20% по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (1).

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40% выше), по

сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (3) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (1), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (1). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (2) и перед стадией (3) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (3) является такой же, как процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (3) отличается на не более чем 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12% от процентной доли центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (3) отличается на не более чем 5 или 10% от процентной доли центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (3) является уменьшенной по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (3) уменьшена на по меньшей мере 10 или 20% по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (3) уменьшена на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных

Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (1).

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) демонстрирует более низкую процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти (например, на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40% ниже), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (3) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (1), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (1). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) демонстрирует более низкую процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти (например, на по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40% ниже), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (2) и перед стадией (3) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) после введения in vivo персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% более высоком) (например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 1 в отношении фиг. 4C) по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (3) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (1), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (1). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) после введения in vivo персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% более высоком) (например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 1 в отношении фиг. 4C) по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (2) и перед стадией (3) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) не является размножившейся, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) является размножившейся с увеличением численности на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления количество живых

клеток в популяции клеток из стадии (3) является уменьшенным по сравнению с количеством живых клеток в популяции клеток в начале стадии (1), например, согласно оценке по количеству живых клеток.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) не является размножившейся по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1), например, согласно оценке по количеству живых клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (3) является размножившейся за менее чем 0,5, 1, 1,5 или 2 часа, например, менее чем 1 или 1,5 часа, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1).

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток не приводят в контакт in vitro с (A) средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или (B) средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, или, в случае приведения в контакт, продолжительность стадии приведения в контакт составляет менее 2 часов, например, не более 1 или 1,5 часа. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой средство, которое стимулирует CD3 (например, антитело к CD3). В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28, ICOS, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD226 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, выбрано из антитела (например, однодоменного антитела (например, антитела из одного вариабельного домена тяжелой цепи), пептитела, Fab-фрагмента или scFv), малой молекулы или лиганда (например, существующего в природе, рекомбинантного или химерного лиганда).

В некоторых вариантах осуществления стадии (1) и/или (2) проводят в средах для клеток, содержащих не более 5, 4, 3, 2, 1 или 0% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления стадии (1) и/или (2) проводят в средах для клеток, содержащих не более 2% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления стадии (1) и/или (2) проводят в средах для клеток, содержащих приблизительно 2% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления стадии (1) и/или (2) проводят в средах для клеток, содержащих ингибитор LSD1 или ингибитор MALT1. В некоторых вариантах осуществления стадию (1) проводят в средах для клеток, содержащих не более 5, 4, 3, 2, 1 или 0% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления стадию (1) проводят в средах для клеток, содержащих не более 2% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления стадию (1) проводят в средах для клеток, содержащих приблизительно 2% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления стадию (2) проводят в средах для клеток, содержащих не более 5, 4, 3, 2, 1

или 0% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления стадию (2) проводят в средах для клеток, содержащих не более 2% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления стадию (2) проводят в средах для клеток, содержащих приблизительно 2% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления стадию (1) проводят в средах для клеток, содержащих ингибитор LSD1 или ингибитор MALT1. В некоторых вариантах осуществления стадию (2) проводят в средах для клеток, содержащих ингибитор LSD1 или ингибитор MALT1.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) (iv) получение свежего продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как свежий продукт, представляющий собой цельную кровь, свежий продукт, представляющий собой костный мозг, или свежий продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, свежий продукт, полученный в результате тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) (v) выделение популяции клеток (например, Т-клеток, например, CD8+ и/или CD4+ Т-клеток), приводимых в контакт на стадии (i), из свежего продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как свежий продукт, представляющий собой цельную кровь, свежий продукт, представляющий собой костный мозг, или свежий продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, свежий продукт, полученный в результате тимэктомии)). В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) проводят не позже чем через 35, 36 или 48 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 30, 36 или 48 часов после начала стадии (v). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в конце стадии (v).

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) получение криоконсервированных Т-клеток, выделенных из продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, как, например, криоконсервированных Т-клеток, выделенных из цельной крови, костного мозга или продукта, полученного в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) (iv) получение криоконсервированного продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как криоконсервированный продукт, представляющий собой цельную кровь,

криоконсервированный продукт, представляющий собой костный мозг, или криоконсервированный продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, криоконсервированный продукт, полученный в результате тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные способы дополнительно включают перед стадией (i) (v) выделение популяции клеток (например, Т-клеток, например, CD8+ и/или CD4+ Т-клеток), приводимых в контакт на стадии (i), из криоконсервированного продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как криоконсервированный продукт, представляющий собой цельную кровь, криоконсервированный продукт, представляющий собой костный мозг, или криоконсервированный продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, криоконсервированный продукт, полученный в результате тимэктомии)). В некоторых вариантах осуществления стадию (iii) проводят не позже чем через 35, 36 или 48 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 30, 36 или 48 часов после начала стадии (v). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в конце стадии (v).

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток в начале стадии (i) или стадии (1) была обогащена клетками, экспрессирующими IL6R (например, клетками, которые являются положительными по IL6Rα и/или IL6Rβ). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток в начале стадии (i) или стадии (1) содержит не менее 40, 45, 50, 55, 60, 65 или 70% клеток, экспрессирующих IL6R (например, клеток, которые являются положительными по IL6Rα и/или IL6Rβ).

В некоторых вариантах осуществления стадии (i) и (ii) или стадии (1) и (2) проводят в средах для клеток, содержащих IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления IL-15 обеспечивает увеличение способности популяции клеток к размножению, например, спустя 10, 15, 20 или 25 дней. В некоторых вариантах осуществления IL-15 обеспечивает увеличение процентной доли клеток, экспрессирующих IL6Rβ, в популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов способы осуществляют в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления все из отделения, активации, трансдукции, инкубирования и промывания Т-клеток проводят в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов способы осуществляют в отдельных устройствах. В некоторых вариантах осуществления отделение, активацию, трансдукцию, инкубирование и промывание Т-клеток проводят в отдельных устройствах.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов способы дополнительно включают добавление вспомогательного вещества или реагента, усиливающего трансдукцию, в среду для культивирования клеток для повышения эффективности трансдукции. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество или реагент, усиливающий трансдукцию, содержит катионный полимер. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество или реагент, усиливающий трансдукцию, выбраны из LentiBOOST™ (Sirion Biotech), вектофусина-1, F108 (полоксамера 338 или Pluronic® F-38), сульфата протамина, бромида гексадиметрина (полибрена), PEA, Pluronic F68, Pluronic F127, Synperonic или LentiTrans™. В некоторых вариантах осуществления реагент, усиливающий трансдукцию, представляет собой LentiBOOST™ (Sirion Biotech). В некоторых вариантах осуществления реагент, усиливающий трансдукцию, представляет собой F108 (полоксамер 338 или Pluronic® F-38).

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов трансдукция популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора включает воздействие на популяцию клеток и вирусный вектор центробежной силы в условиях, при которых повышается эффективность трансдукции. В одном варианте осуществления клетки трансдуцируют путем спинокуляции.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов клетки (например, Т-клетки) активируют и трансдуцируют в колбе для культивирования клеток, содержащей газопроницаемую мембрану в основании, которая предоставляет возможность работы с большими объемами сред без существенного нарушения газообмена. В некоторых вариантах осуществления рост клеток достигается путем предоставления доступа, например, по существу непрерывного доступа, к питательным веществам посредством конвекции.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, выбранным из CD19, CD20, CD22, BCMA, мезотелина, EGFRvIII, GD2, Tn-антигена, sTn-антигена, Tn-O-гликопептидов, sTn-O-гликопептидов, PSMA, CD97, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, KIT, IL-13Ra2, легумана, GD3, CD171, IL-11Ra, PSCA, MAD-CT-1, MAD-CT-2, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB (например, ERBB2), Her2/neu, MUC1, EGFR, NCAM, эфрина B2, CAIX, LMP2, sLe, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, FAP, легумаина, E6 или E7 HPV, ML-IAP, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, полисиаловой кислоты, Fos-родственного антигена, эластазы нейтрофилов, TRP-2, CYP1B1, белка спермы 17, бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека, AFP, тиреоглобулина, PLAC1, globoH, RAGE1, MN-CA IX, обратной транскриптазы теломеразы человека, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного

варианта hsp 70-2, NA-17, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, NY-ESO-1, GPR20, Ly6k, OR51E2, TARP, GFRα4 или пептида любого из этих антигенов, презентированного на MHC. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит VH и VL, где VH и VL соединены линкером, где необязательно линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63 или 104.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает в себя трансмембранный домен белка, выбранного из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает в себя трансмембранный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранный домен, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 17 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен соединен с трансмембранным доменом с помощью шарнирной области. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 3 или 4 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую шарнирную область, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, 14 или 15 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из CD3-дзета, TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcεRI, DAP10, DAP12 или CD66d. В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первичный сигнальный домен, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20 или 21 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из молекулы MHC I класса, белкового рецептора TNF, иммуноглобулиноподобного белка, рецептора цитокина, интегрина, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (белка SLAM), активирующего рецептора NK-клеток, BTLA, лиганда Toll-подобного рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, 4-1BB (CD137), B7-H3, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD28-OX40, CD28-4-1BB или лиганда, который специфично связывается с CD83. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую костимулирующий сигнальный домен, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 18 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из 4-1BB, и функциональный сигнальный домен, полученный из CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 7 (или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней) и аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10 (или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит лидерную последовательность, включающую в себя аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описана популяция клеток, экспрессирующих CAR (например, аутологичных или аллогенных Т-клеток или NK-клеток, экспрессирующих CAR), полученная посредством любого из вышеуказанных способов или любого другого способа, раскрытого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, экспрессирующих CAR, раскрытую в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления в конечном продукте на основе клеток с CAR, изготовленном с применением способов, описанных в данном документе, общее количество гранул (например, гранул с антителами к CD4, гранул с антителами к CD8 и/или гранул TransAct) составляет не более 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5% от общего количества гранул, добавляемых в ходе способа изготовления.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описана популяция клеток, экспрессирующих CAR (например, аутологичных или аллогенных Т-клеток или NK-клеток, экспрессирующих CAR), предусматривающая одну или несколько из следующих характеристик: (a) приблизительно такую же процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ Т-клеток, по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR; (b) изменение количества необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ Т-клеток, находящееся в пределах от приблизительно 5% до приблизительно 10%, например, по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR; (c) увеличенную процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ Т-клеток, например, увеличенную в по меньшей мере 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 или 3 раза, по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в той же

популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR; (d) приблизительно такую же процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR; (e) изменение количества центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, находящееся в пределах от приблизительно 5% до приблизительно 10%, по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR; (f) уменьшенную процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, например, уменьшенную на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50%, по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR; (g) приблизительно такую же процентную долю стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR; (h) изменение количества стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, находящееся в пределах от приблизительно 5% до приблизительно 10%, по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR; или (i) увеличенную процентную долю стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описана популяция клеток, экспрессирующих CAR (например, аутологичных или аллогенных Т-клеток или NK-клеток, экспрессирующих CAR), где (a) медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 75, 100 или 125%; (b) медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых

в Teff) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150 или 200%; (c) медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150, 200 или 250%; (d) медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 125, 150, 175 или 200%; или (e) медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 180, 190, 200 или 210%.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описан способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту популяции клеток, экспрессирующих CAR, раскрытой в данном документе, или фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, за счет чего обеспечивается усиление иммунного ответа у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыт способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту популяции клеток, экспрессирующих CAR, раскрытой в данном документе, или фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, за счет чего обеспечивается лечение рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак, например, выбранный из одного или нескольких из мезотелиомы, злокачественной мезотелиомы плевры, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака легкого, крупноклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, аденокарциномы пищевода, рака молочной железы, глиобластомы, рака яичника, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака кожи, меланомы, рака почки, рака печени, рака головного мозга, тимомы, саркомы, карциномы, рака матки, рака почки, рака желудочно-кишечного тракта, уротелиального рака, рака глотки, рака головы и шеи, рака прямой кишки, рака пищевода или рака мочевого пузыря или их метастазов. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз, например, выбранный из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мантийноклеточной лимфомы (MCL),

множественной миеломы, острого лимфоидного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфоидного лейкоза (BALL), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (TALL), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (SLL), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), DLBCL, ассоциированной с хроническим воспалением, хронического миелоидного лейкоза, миелопролиферативных новообразований, фолликулярной лимфомы, педиатрической фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы (экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны из лимфоидной ткани слизистых оболочек), лимфомы из клеток маргинальной зоны, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки, лимфомы/лейкоза селезенки, диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки, варианта волосатоклеточного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, болезни тяжелых цепей, плазмоклеточной миеломы, солитарной плазмоцитомы кости, внекостной плазмоцитомы, нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, педиатрической нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, первичной кожной лимфомы из клеток центра фолликула, лимфоматоидного гранулематоза, первичной медиастинальной (тимической) крупноклеточной В-клеточной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ALK+ крупноклеточной В-клеточной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастлемана, первичной выпотной лимфомы, В-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML) или неклассифицируемой лимфомы.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту второго терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой противораковое терапевтическое средство, например, средство химиотерапии, лучевой терапии или иммунорегуляторной терапии. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)).

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана молекула антитела, которая связывает CD28, содержащая вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, где (i) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 538, 539, 540, 530, 531 и 532 соответственно; (ii) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные

последовательности под SEQ ID NO: 541, 539, 540, 530, 531 и 532 соответственно; (iii) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 542, 543, 540, 533, 534 и 535 соответственно; или (iv) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 544, 545, 546, 536, 534 и 532 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к CD28, описанная в данном документе, содержит (i) VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 547 или 548 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 547 или 548; и/или (ii) VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 537 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к CD28 содержит (i) VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 547 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 537 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; или (ii) VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 548 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 537 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к CD28 представляет собой антитело человека, полноразмерное антитело, биспецифическое антитело, Fab, F(ab')2, Fv или одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления молекула антитела содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и константную область легкой цепи, выбранную из константных областей легких каппа- или лямбда-цепей.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана молекула антитела, которая (i) конкурирует за связывание с CD28 с молекулой антитела к CD28, описанной в данном документе; и/или (ii) связывается с тем же эпитопом, по существу тем же эпитопом, что и эпитоп молекулы антитела к CD28, описанной в данном документе, эпитопом, который перекрывается с ним, или эпитопом, который по существу перекрывается с ним.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана полиспецифическая связывающая молекула, содержащая: (i) домен, связывающий CD3, и (ii) антигенсвязывающий домен для CD28, содержащий молекулу антитела к CD28, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит: (i) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из молекулы антитела к CD3 из таблицы 27 (например, антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2), антитела к CD3 (3) или антитела к CD3 (4)); (ii) аминокислотную последовательность

любой из VH- и/или VL-областей молекулы антитела к CD3, представленной в таблице 27 (например, антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2), антитела к CD3 (3) или антитела к CD3 (4)), или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную ей.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана полиспецифическая связывающая молекула, содержащая первый связывающий домен и второй связывающий домен: (i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH первого связывающего домена, VL первого связывающего домена, VH второго связывающего домена, CH1, CH2 и CH3; и (ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL второго связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен включает в себя домен, связывающий CD3, а второй связывающий домен включает в себя домен, связывающий костимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен включает в себя домен, связывающий костимулирующую молекулу, а второй связывающий домен включает в себя домен, связывающий CD3. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, включает в себя домен, связывающий CD2, или домен, связывающий CD28.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана полиспецифическая связывающая молекула, содержащая первый связывающий домен и второй связывающий домен: (i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH второго связывающего домена, CH1, CH2, CH3, VH первого связывающего домена и VL первого связывающего домена; и (ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL второго связывающего домена и CL.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен включает в себя домен, связывающий CD3, а второй связывающий домен включает в себя домен, связывающий костимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен включает в себя домен, связывающий костимулирующую молекулу, а второй связывающий домен включает в себя домен, связывающий CD3. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, включает в себя домен, связывающий CD2, или домен, связывающий CD28.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана полиспецифическая связывающая молекула, содержащая первый связывающий домен и второй связывающий домен: (i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH второго связывающего домена, CH1, VH первого связывающего домена, VL первого связывающего домена, CH2 и CH3; и (ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL второго связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен включает в себя домен, связывающий CD3, а второй связывающий домен включает в себя домен, связывающий костимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен включает в себя домен, связывающий костимулирующую молекулу, а второй связывающий домен включает в себя домен, связывающий CD3. В некоторых вариантах осуществления домен,

связывающий костимулирующую молекулу, включает в себя домен, связывающий CD2, или домен, связывающий CD28.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ активации клеток (например, иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток), включающий приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта лейкафереза) в контакт (например, связывание) с полиспецифической связывающей молекулой, описанной в данном документе.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ трансдукции клеток (например, иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток), включающий приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта лейкафереза) в контакт (например, связывание) с (i) полиспецифической связывающей молекулой, описанной в данном документе, и (ii) молекулой нуклеиновой кислоты, например, молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR.

Специалистам в данной области будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, или они будут способны установить такие эквиваленты посредством проведения только обычных экспериментов. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются нижеследующими пронумерованными вариантами осуществления.

Пронумерованные варианты осуществления

1. Способ получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), при этом способ включает:

(i) приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта лейкафереза) в контакт (например, связывание) с (A) средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или (B) средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток;

(ii) приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей CAR, за счет чего обеспечивается получение популяции клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и

(iii) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторного составления популяции клеток в среде для криоконсервации) или введения, где:

(a) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и

стадию (iii) проводят не позже чем через 30 (например, 26) часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (i),

(b) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и

стадию (iii) проводят не позже чем через 30 часов после начала стадии (ii), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 часов после начала стадии (ii), или

(c) популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i),

где необязательно молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в вирусном векторе, где необязательно молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу РНК в вирусном векторе, где необязательно стадия (ii) включает трансдукцию популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, где необязательно стадия (ii) дополнительно включает добавление F108 в качестве вспомогательного вещества в ходе трансдукции и/или приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с shRNA, которая целенаправленно воздействует на Tet2.

2. Способ согласно варианту осуществления 1, где средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой средство, которое стимулирует CD3 (например, фрагмент антитела к CD3 или к TCR, содержащий соответствующие CDR, представленные в **таблице 27**), и где средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28 или CD2 (например, фрагмент антитела к CD28 или к CD2, содержащий соответствующие CDR, представленные в **таблице 27**), или любую их комбинацию, где необязательно средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляющее собой средство, которое стимулирует CD3, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержатся в полиспецифической связывающей молекуле, необязательно биспецифическом антителе, которое имеет конфигурацию согласно любой из схем, представленных на **фиг. 50A**.

3. Способ согласно вариантам осуществления 1 или 2, где стадия (i) обеспечивает увеличение процентной доли клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii), например, популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более высокую процентную долю клеток, экспрессирующих CAR (например, на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50 или 60% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа без стадии (i).

4. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где:

(a) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является такой же, как процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-

клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от нее на не более чем 5 или 10%;

(b) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) увеличена, например, в по меньшей мере 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 или 3 раза по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (i);

(c) процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток увеличивается в ходе стадии (ii), например, увеличивается, например, на по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%, в течение 18-24 часов после начала стадии (ii); или

(d) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) не уменьшается или уменьшается на не более чем 5 или 10% по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (i).

5. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где:

(a) популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(b) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой (например, в по меньшей мере 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 или 3 раза выше), чем процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(c) процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой (например, в по меньшей мере 4, 6, 8, 10 или 12 раз выше), чем процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(d) популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более высокую процентную

долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(e) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой (например, в по меньшей мере 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 или 3 раза выше), чем процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней; или

(f) процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой (например, в по меньшей мере 4, 6, 8, 10 или 12 раз выше), чем процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

6. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где:

(a) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (iii) является такой же, как процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (i) или отличается от нее на не более чем 5 или 10%;

(b) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является уменьшенной на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток в начале стадии (i);

(c) процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ клеток, экспрессирующих CAR, уменьшается в ходе стадии (ii), например, уменьшается, например, на по меньшей мере 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20% в течение 18-24 часов после начала стадии (ii); или

(d) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) не является увеличенной или является увеличенной на не более чем 5 или 10% по сравнению

с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток в начале стадии (i).

7. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где:

(a) популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более низкую процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% ниже), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(b) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более низкой (например, на по меньшей мере 20, 30, 40 или 50% ниже), чем процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(c) процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более низкой (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% ниже), чем процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(d) популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более низкую процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% ниже), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(e) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более низкой (например, на по меньшей мере 20, 30, 40 или 50% ниже), чем процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней; или

(f) процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более низкой (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% ниже), чем процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

8. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где:

(a) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является увеличенной по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток в начале стадии (i);

(b) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является увеличенной по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток в начале стадии (i);

(c) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i); или

(d) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(e) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после

стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней; или

(f) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

9. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-8, где:

(a) медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 75, 100 или 125%;

(b) медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 100, 150, 200, 250 или 300% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(c) медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150 или 200%;

(d) медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 50, 100, 125, 150 или 175% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(e) медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150, 200 или 250%;

(f) медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 50, 100 или 125% ниже), чем медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(g) медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 125, 150, 175 или 200%;

(h) медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 40, 50, 60, 70 или 80% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(j) медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно

180, 190, 200 или 210%; или

(k) медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 20, 30 или 40% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

10. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-9, где популяция клеток из стадии (iii) после инкубирования с клеткой, экспрессирующей антиген, распознаваемый CAR, секретирует IL-2 на более высоком уровне (например, в по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 14 раз более высоком), чем клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней, например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 8 в отношении фиг. 29C-29D.

11. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-10, где популяция клеток из стадии (iii) после введения in vivo персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 1 в отношении фиг. 4C) по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

12. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-11, где популяция клеток из стадии (iii) после введения in vivo демонстрирует более сильную противоопухолевую активность (например, более сильную противоопухолевую активность при низкой дозе, например, дозе, составляющей не более $0{,}15\times10^6$, $0{,}2\times10^6$, $0{,}25\times10^6$ или $0{,}3\times10^6$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR), чем клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

13. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i), где необязательно количество живых клеток в популяции клеток из стадии (iii) является уменьшенным по сравнению с количеством живых клеток в популяции клеток в начале стадии (i).

14. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-13, где популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся за менее чем 2 часа, например, менее чем 1 или 1,5 часа, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i).

15. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-14, где стадии (i) и/или (ii) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-7, IL-21, IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra), ингибитор LSD1, ингибитор MALT1 или их комбинацию.

16. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-15, где стадии (i) и/или (ii) проводят в бессывороточных средах для клеток, содержащих заменитель сыворотки.

17. Способ согласно варианту осуществления 16, где заменитель сыворотки представляет собой заменитель сыворотки для иммунных клеток (ICSR) CTS™.

18. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-17, дополнительно включающий перед стадией (i):

(iv) (необязательно) получение свежего продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как свежий продукт, представляющий собой цельную кровь, свежий продукт, представляющий собой костный мозг, или свежий продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, свежий продукт, полученный в результате тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения, и

(v) выделение популяции клеток (например, Т-клеток, например, CD8+ и/или CD4+ Т-клеток), приводимых в контакт на стадии (i), из свежего продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как свежий продукт, представляющий собой цельную кровь, свежий продукт, представляющий собой костный мозг, или свежий продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, свежий продукт, полученный в результате тимэктомии)), где необязательно:

стадию (iii) проводят не позже чем через 35 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 часов после начала

стадии (v), например, не позже чем через 30 часов после начала стадии (v), или

популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в конце стадии (v).

19. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-17, дополнительно включающий перед стадией (i) получение криоконсервированных Т-клеток, выделенных из продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, как, например, криоконсервированных Т-клеток, выделенных из цельной крови, костного мозга или продукта, полученного в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения.

20. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-17, дополнительно включающий перед стадией (i):

(iv) (необязательно) получение криоконсервированного продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как криоконсервированный продукт, представляющий собой цельную кровь, криоконсервированный продукт, представляющий собой костный мозг, или криоконсервированный продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, криоконсервированный продукт, полученный в результате тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения, и

(v) выделение популяции клеток (например, Т-клеток, например, CD8+ и/или CD4+ Т-клеток), приводимых в контакт на стадии (i), из криоконсервированного продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как криоконсервированный продукт, представляющий собой цельную кровь, криоконсервированный продукт, представляющий собой костный мозг, или криоконсервированный продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, криоконсервированный продукт, полученный в результате тимэктомии)), где необязательно:

стадию (iii) проводят не позже чем через 35 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 30 часов после начала стадии (v), или

популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в конце стадии (v).

21. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-20, дополнительно включающий стадию (vi):

культивирование части популяции клеток из стадии (iii) в течение по меньшей мере 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 или 7 дней, например, в течение по меньшей мере 2 дней и

не более 7 дней, и измерение уровня экспрессии CAR в этой части (например, измерение процентной доли жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, в этой части), где необязательно:

стадия (iii) включает сбор и замораживание популяции клеток (например, Т-клеток), и стадия (vi) включает размораживание части популяции клеток из стадии (iii), культивирование этой части в течение по меньшей мере 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 или 7 дней, например, в течение по меньшей мере 2 дней и не более 7 дней, и измерение уровня экспрессии CAR в этой части (например, измерение процентной доли жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, в этой части).

22. Способ получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), при этом способ включает:

(1) приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного продукта лейкафереза) в контакт с цитокином, выбранным из IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-6 или их комбинации,

(2) приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей CAR, за счет чего обеспечивается получение популяции клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и

(3) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторного составления популяции клеток в среде для криоконсервации) или введения, где:

(a) стадию (2) проводят вместе со стадией (1) или не позже чем через 5 часов после начала стадии (1), например, не позже чем через 1, 2, 3, 4 или 5 часов после начала стадии (1), и

стадию (3) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (1), например, не позже чем через 22, 23 или 24 часа после начала стадии (1), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (1), или

(b) популяция клеток из стадии (3) не является размножившейся или является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1),

где необязательно молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в вирусном векторе, где необязательно молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) представляет собой молекулу РНК в вирусном векторе, где необязательно стадия (2) включает трансдукцию популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, где необязательно стадия (2) дополнительно включает добавление F108 в качестве вспомогательного вещества в ходе трансдукции и/или приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с shRNA, которая целенаправленно воздействует на Tet2.

23. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает

приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-2.

24. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-7.

25. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)).

26. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-21.

27. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra).

28. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-7 и IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)).

29. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-7 и IL-21.

30. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-21.

31. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-21.

32. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra) и IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)).

33. Способ согласно варианту осуществления 22, где стадия (1) включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с IL-2 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra).

34. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-33, где популяция клеток из стадии (3) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток среди клеток, экспрессирующих CAR (например, на по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает приведение популяции клеток в контакт, например, с антителом к CD3.

35. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-34, где процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (3):

(a) является такой же, как процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (1), или отличается от нее на не более чем 5 или 10%, или

(b) является увеличенной, например, увеличенной на по меньшей мере 10 или 20%, по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (1).

36. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-35, где популяция клеток из стадии (3) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (3) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (1), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (1).

37. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-36, где популяция клеток из стадии (3) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (2) и перед стадией (3) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

38. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-37, где популяция клеток из стадии (3) после введения in vivo персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 1 в отношении фиг. 4C) по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (3) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (1), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (1).

39. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-38, где популяция клеток из стадии (3) после введения in vivo персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 1 в отношении фиг. 4C) по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (2) и перед стадией (3) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

40. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-39, где популяция клеток из стадии (3) не является размножившейся или является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1), где необязательно количество живых клеток в популяции клеток из стадии (3) является уменьшенным по сравнению с количеством живых клеток в популяции клеток в начале стадии (1).

41. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-40, где популяция клеток из стадии (3) не является размножившейся или является размножившейся за менее

чем 2 часа, например, менее чем 1 или 1,5 часа, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1).

42. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-41, где популяцию клеток не приводят в контакт in vitro с (A) средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или (B) средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, или, в случае приведения в контакт, продолжительность стадии приведения в контакт составляет менее 2 часов, например, не более 1 или 1,5 часа.

43. Способ согласно варианту осуществления 42, где средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой средство, которое стимулирует CD3 (например, фрагмент антитела к CD3 или к TCR, содержащий соответствующие CDR, представленные в **таблице 27**), и где средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28 или CD2 (например, фрагмент антитела к CD28 или к CD2, содержащий соответствующие CDR, представленные в **таблице 27**), или любую их комбинацию, где необязательно средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляющее собой средство, которое стимулирует CD3, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержатся в полиспецифической связывающей молекуле, необязательно биспецифическом антителе, которое имеет конфигурацию согласно любой из схем, представленных на **фиг. 50A**.

44. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-43, где стадии (1) и/или (2) проводят в средах для клеток, содержащих:

не более 5, 4, 3, 2, 1 или 0% сыворотки, где необязательно стадии (1) и/или (2) проводят в средах для клеток, содержащих приблизительно 2% сыворотки, или

ингибитор LSD1 или ингибитор MALT1.

45. Способ согласно любому из вариантов осуществления 22-44, дополнительно включающий получение криоконсервированного продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как криоконсервированный продукт, представляющий собой цельную кровь, криоконсервированный продукт, представляющий собой костный мозг, или криоконсервированный продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, криоконсервированный продукт, полученный в результате тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения.

46. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-45, где популяция клеток в начале стадии (i) или стадии (1) была обогащена клетками, экспрессирующими IL6R (например, клетками, которые являются положительными по IL6Rα и/или IL6Rβ).

47. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-46, где популяция клеток в начале стадии (i) или стадии (1) содержит не менее 50, 60 или 70% клеток, экспрессирующих IL6R (например, клеток, которые являются положительными по IL6Rα и/или IL6Rβ).

48. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-47, где стадии (i) и (ii) или стадии (1) и (2) проводят в средах для клеток, содержащих IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)).

49. Способ согласно варианту осуществления 48, где IL-15 обеспечивает увеличение способности популяции клеток к размножению, например, спустя 10, 15, 20 или 25 дней.

50. Способ согласно варианту осуществления 48, где IL-15 обеспечивает увеличение процентной доли клеток, экспрессирующих IL6Rβ, в популяции клеток.

51. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-50, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

52. Способ согласно варианту осуществления 51, где антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, выбранным из CD19, CD20, CD22, BCMA, мезотелина, EGFRvIII, GD2, Tn-антигена, sTn-антигена, Tn-O-гликопептидов, sTn-O-гликопептидов, PSMA, CD97, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, KIT, IL-13Ra2, легумана, GD3, CD171, IL-11Ra, PSCA, MAD-CT-1, MAD-CT-2, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB (например, ERBB2), Her2/neu, MUC1, EGFR, NCAM, эфрина B2, CAIX, LMP2, sLe, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, FAP, легумаина, E6 или E7 HPV, ML-IAP, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, полисиаловой кислоты, Fos-родственного антигена, эластазы нейтрофилов, TRP-2, CYP1B1, белка спермы 17, бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека, AFP, тиреоглобулина, PLAC1, globoH, RAGE1, MN-CA IX, обратной транскриптазы теломеразы человека, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного варианта hsp 70-2, NA-17, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, NY-ESO-1, GPR20, Ly6k, OR51E2, TARP, GFRα4 или пептида любого из этих антигенов, презентированного на MHC.

53. Способ согласно вариантам осуществления 51 или 52, где антигенсвязывающий домен содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в данном документе, где необязательно:

(a) антигенсвязывающий домен связывается с BCMA и содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в таблицах 3-15, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней;

(b) антигенсвязывающий домен связывается с CD19 и содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в таблице 2, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней;

(c) антигенсвязывающий домен связывается с CD20 и содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в данном документе, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%

идентичностью с ней; или

(d) антигенсвязывающий домен связывается с CD22 и содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в данном документе, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней.

54. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51-53, где антигенсвязывающий домен содержит VH и VL, где VH и VL соединены линкером, где необязательно линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63 или 104.

55. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51-54, где:

(a) трансмембранный домен включает в себя трансмембранный домен белка, выбранного из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154,

(b) трансмембранный домен включает в себя трансмембранный домен CD8,

(c) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, или

(d) молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранный домен, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 17 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

56. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51-55, где антигенсвязывающий домен соединен с трансмембранным доменом с помощью шарнирной области, где необязательно:

(a) шарнирная область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 3 или 4 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, или

(b) молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую шарнирную область, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, 14 или 15 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

57. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51-56, где внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен, где необязательно первичный сигнальный домен включает в себя функциональный

сигнальный домен, полученный из CD3-дзета, TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcεRI, DAP10, DAP12 или CD66d, где необязательно:

(a) первичный сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из CD3-дзета,

(b) первичный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; или

(c) молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первичный сигнальный домен, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20 или 21 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

58. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51-57, где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен, где необязательно костимулирующий сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из молекулы MHC I класса, белкового рецептора TNF, иммуноглобулиноподобного белка, рецептора цитокина, интегрина, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (белка SLAM), активирующего рецептора NK-клеток, BTLA, лиганда Toll-подобного рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, 4-1BB (CD137), B7-H3, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD28-OX40, CD28-4-1BB или лиганда, который специфично связывается с CD83, где необязательно:

(a) костимулирующий сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из 4-1BB,

(b) костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, или

(c) молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую костимулирующий сигнальный домен, где последовательность

нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 18 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

59. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51-58, где внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен, полученный из 4-1BB, и функциональный сигнальный домен, полученный из CD3-дзета, где необязательно внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 (или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней) и аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10 (или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней), где необязательно внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10.

60. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51-59, где CAR дополнительно содержит лидерную последовательность, включающую в себя аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

61. Популяция клеток, экспрессирующих CAR (например, аутологичных или аллогенных Т-клеток или NK-клеток, экспрессирующих CAR), полученная посредством способа согласно любому из вариантов осуществления 1-60.

62. Популяция клеток, сконструированных таким образом, чтобы они экспрессировали CAR ("популяция клеток, экспрессирующих CAR"), при этом указанная популяция предусматривает:

(a) приблизительно такую же процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ Т-клеток, по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR;

(b) изменение количества необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ Т-клеток, находящееся в пределах от приблизительно 5% до приблизительно 10%, например, по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR;

(c) увеличенную процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ Т-клеток, например, увеличенную в по меньшей мере 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 или 3 раза, по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RO- CCR7+ клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они

экспрессировали CAR;

(d) приблизительно такую же процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR;

(e) изменение количества центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, находящееся в пределах от приблизительно 5% до приблизительно 10%, по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR;

(f) уменьшенную процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, например, уменьшенную на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50%, по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR;

(g) приблизительно такую же процентную долю стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR;

(h) изменение количества стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, находящееся в пределах от приблизительно 5% до приблизительно 10%, по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR; или

(i) увеличенную процентную долю стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR.

63. Популяция клеток, сконструированных таким образом, чтобы они экспрессировали CAR ("популяция клеток, экспрессирующих CAR"), где:

(a) медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для той же популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали

CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 75, 100 или 125%;

(b) медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150 или 200%;

(c) медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150, 200 или 250%;

(d) медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 125, 150, 175 или 200%; или

(e) медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток до их конструирования таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 180, 190, 200 или 210%.

64. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, экспрессирующих CAR, согласно любому из вариантов осуществления 61-63 и фармацевтически приемлемый носитель.

65. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту популяции клеток, экспрессирующих CAR, согласно любому из вариантов осуществления 61-63 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 64, за счет чего обеспечивается усиление иммунного ответа у субъекта.

66. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту популяции клеток, экспрессирующих CAR, согласно любому из вариантов осуществления 61-63 или фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 64, за счет чего обеспечивается лечение рака у субъекта.

67. Способ согласно варианту осуществления 66, где рак представляет собой солидный рак, например, выбранный из одного или нескольких из мезотелиомы, злокачественной мезотелиомы плевры, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака легкого, крупноклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, аденокарциномы пищевода, рака молочной железы, глиобластомы, рака яичника,

колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака кожи, меланомы, рака почки, рака печени, рака головного мозга, тимомы, саркомы, карциномы, рака матки, рака почки, рака желудочно-кишечного тракта, уротелиального рака, рака глотки, рака головы и шеи, рака прямой кишки, рака пищевода или рака мочевого пузыря или их метастазов.

68. Способ согласно варианту осуществления 66, где рак представляет собой гемобластоз, например, выбранный из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), множественной миеломы, острого лимфоидного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфоидного лейкоза (BALL), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (TALL), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (SLL), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), DLBCL, ассоциированной с хроническим воспалением, хронического миелоидного лейкоза, миелопролиферативных новообразований, фолликулярной лимфомы, педиатрической фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы (экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны из лимфоидной ткани слизистых оболочек), лимфомы из клеток маргинальной зоны, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки, лимфомы/лейкоза селезенки, диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки, варианта волосатоклеточного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, болезни тяжелых цепей, плазмоклеточной миеломы, солитарной плазмоцитомы кости, внекостной плазмоцитомы, нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, педиатрической нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, первичной кожной лимфомы из клеток центра фолликула, лимфоматоидного гранулематоза, первичной медиастинальной (тимической) крупноклеточной В-клеточной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ALK+ крупноклеточной В-клеточной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастлемана, первичной выпотной лимфомы, В-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML) или неклассифицируемой лимфомы.

69. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-68, дополнительно включающий введение субъекту второго терапевтического средства.

70. Способ согласно варианту осуществления 69, где второе терапевтическое средство представляет собой IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)).

71. Способ согласно варианту осуществления 69, где второе терапевтическое средство представляет собой ибрутиниб.

72. Способ согласно варианту осуществления 71, где ибрутиниб вводят один раз в

день в дозе, составляющей приблизительно 600 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 480 мг, приблизительно 460 мг, приблизительно 440 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 280 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 190 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 120 мг или 100 мг.

73. Способ согласно варианту осуществления 71, где ибрутиниб вводят один раз в день в дозе, составляющей 420 мг, 280 мг или 140 мг.

74. Способ согласно любому из вариантов осуществления 71-73, где ибрутиниб вводят до введения, одновременно с введением или после введения популяции клеток, экспрессирующих CAR.

75. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-74, где популяцию клеток, экспрессирующих CAR, вводят в дозе, определенной на основании процентной доли клеток, экспрессирующих CAR, измеренной в варианте осуществления 21.

76. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-75, где популяцию клеток, экспрессирующих CAR (например, клетки, экспрессирующие CAR для CD19), вводят в дозе, составляющей от приблизительно $0,5\times10^6$ до 50×10^6 жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, например, приблизительно 5×10^6 жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, где необязательно популяцию клеток, экспрессирующих CAR (например, клетки, экспрессирующие CAR для CD19), вводят в дозе, составляющей 5×10^6 жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR.

77. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-75, где популяцию клеток, экспрессирующих CAR (например, клетки, экспрессирующие CAR для CD19), вводят в дозе, составляющей от приблизительно $2,5\times10^6$ до $2,5\times10^8$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, например, приблизительно $2,5\times10^7$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, где необязательно популяцию клеток, экспрессирующих CAR (например, клетки, экспрессирующие CAR для CD19), вводят в дозе, составляющей $2,5\times10^7$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR.

78. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-75, где популяцию клеток, экспрессирующих CAR (например, клетки, экспрессирующие CAR для CD19), вводят в дозе, составляющей от приблизительно $1,25\times10^7$ до $1,25\times10^9$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, например, приблизительно $1,25\times10^8$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, где необязательно популяцию клеток, экспрессирующих CAR (например, клетки, экспрессирующие CAR для CD19), вводят в дозе, составляющей $1,25\times10^8$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR.

79. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-75, где популяцию клеток, экспрессирующих CAR (например, клетки, экспрессирующие CAR для BCMA), вводят в дозе, составляющей от приблизительно $2,5\times10^6$ до $2,5\times10^8$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, например, приблизительно 1×10^7 или

5×10^7жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR.

80. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-79, где у субъекта имеется CLL или SLL.

81. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-79, где у субъекта имеется DLBCL, например, рецидивирующая и/или рефрактерная DLBCL.

82. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-81, где у субъекта отслеживают признаки синдрома высвобождения цитокинов, например, в течение по меньшей мере 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 дней, например, в течение приблизительно 3 дней.

83. Популяция клеток, экспрессирующих CAR, согласно любому из вариантов осуществления 61-63 или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 64 для применения в способе усиления иммунного ответа у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества популяции клеток, экспрессирующих CAR, или эффективного количества фармацевтической композиции.

84. Популяция клеток, экспрессирующих CAR, согласно любому из вариантов осуществления 61-63 или фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 64 для применения в способе лечения рака у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества популяции клеток, экспрессирующих CAR, или эффективного количества фармацевтической композиции.

Хотя при осуществлении на практике или тестировании настоящего изобретения можно применять способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, ниже описываются подходящие способы и материалы. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие литературные источники (например, идентификационные номера последовательностей в базах данных), упоминаемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Например, все последовательности из GenBank, Unigene и Entrez, упоминаемые в данном документе, например, в любой таблице в данном документе, включены посредством ссылки. Если для одного гена или белка представлены ссылки на несколько номеров доступа последовательностей, охватываются все варианты последовательности.

Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предполагаются как ограничивающие. Заголовки, подзаголовки или пронумерованные или обозначенные буквами элементы, например, (a) (b) (i) и т. д., представлены исключительно для удобства прочтения. Использование заголовков или пронумерованных или обозначенных буквами элементов в данном документе не требует того, чтобы стадии или элементы проводились в алфавитном порядке, или того, чтобы стадии или элементы обязательно были отделены друг от друга. Другие признаки, цели и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания и графических материалов, а также из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A-1I. При инкубировании очищенных Т-клеток с цитокинами необученные

клетки представляли собой преобладающую трансдуцированную популяцию. Фиг. 1A представляет собой диаграмму, на которой показан иллюстративный способ с использованием цитокинов. Фиг. 1B представляет собой пару диаграмм, на которых показаны процентные доли CD3+ CAR+ клеток в каждый указанный момент времени после трансдукции. Фиг. 1C представляет собой ряд диаграмм, на которых показана трансдукция в пределах CD3+ CCR7+ CD45RO- популяции в популяциях, стимулированных гранулами с антителами к CD3/CD28 (слева), по сравнению с популяциями, стимулированными только цитокинами (справа), у двух независимых доноров. В образце, называемом "кратковременная стимуляция IL7+IL15" на фиг. 1C клетки стимулировали гранулами в течение 2 дней, а затем их удаляли в присутствии IL7 и IL15. Фиг. 1D, 1E и 1F представляют собой ряд проточно-цитометрических диаграмм, на которых показана трансдукция субпопуляций Т-клеток, культивируемых с IL2 (фиг. 1D), IL15 (фиг. 1E) и IL7+IL15 (фиг. 1F), ежедневно в течение трехдневного периода. Фиг. 1G представляет собой ряд проточно-цитометрических диаграмм, на которых показана дифференцировка Т-клеток в день 0 (слева) и в день 1 (справа) по CCR7 и CD45RO после стимуляции с помощью IL2 (верхняя правая панель) или IL-15 (нижняя правая панель). Фиг. 1H и 1I представляют собой ряд диаграмм, на которых показаны процентные доли CD3+ CCR7+ RO- клеток, CD3+ CCR7+ RO+ клеток, CD3+ CCR7- RO+ клеток и CD3+ CCR7- RO- клеток в день 0 или после 24-часового инкубирования с указанными цитокинами.

Фиг. 2A-2D. CART, полученные с помощью стимуляции цитокинами в течение одного дня, были функциональными. Фиг. 2A. Очищенные Т-клетки трансдуцировали при MOI, составляющей 1, и при всех тестируемых условиях применения цитокинов процентные доли клеток, экспрессирующих CAR, наблюдаемые в день 1 и день 10, были сходными. CART получали в течение одного дня и размножали посредством гранул с антителами к CD3/CD28 после сбора в течение 9 дней с имитацией условий in vivo. Фиг. 2A представляет собой пару диаграмм, на которых показаны средние процентные доли CD3+ CAR+ клеток при каждом условии для CART дня 1 (слева) и CART дня 10 (справа). Фиг. 2B. Потенциал цитотоксичности у CART дня 1 после размножения измеряли с применением Nalm6 в качестве клеток-мишеней. Фиг. 2B представляет собой диаграмму, на которой показан % уничтожения CD19-положительных клеток Nalm6 с помощью CART при каждом условии. CART дня 10, размножаемые с применением гранул с антителами к CD3/CD28, помечены как "день 10." Все другие образцы представляли собой CART дня 1. Фиг. 2C. Тестировали секрецию IFNg размножившимися CART дня 1 в ответ на клетки-мишени Nalm6. Фиг. 2C представляет собой диаграмму, на которой показана величина секреции IFN-гамма CART при каждом условии в присутствии CD19-положительных или CD19-отрицательных клеток-мишеней. Фиг. 2D. Пролиферативный потенциал CART дня 1 тестировали путем измерения уровня включения EDU. Фиг. 2D представляет собой диаграмму, на которой показаны средние процентные доли EDU-положительных клеток для каждого условия. Аналогично фиг. 2B, CART дня 10 помечены

как "день 10", а все другие образцы представляли собой CART дня 1.

Фиг. 3A-3B. Влияние MOI и состава среды на трансдукцию в день 0. Фиг. 3A. Очищенные Т-клетки трансдуцировали при MOI в диапазоне от 1 до 10 в присутствии IL15, IL2+IL15, IL2+IL7 или IL7+IL15. Независимо от применяемого цитокина наблюдали линейное увеличение уровня трансдукции. Фиг. 3A представляет собой ряд диаграмм, где процентные доли CD3+ CAR+ клеток отложены на графике в зависимости от MOI для каждого тестируемого условия. Фиг. 3B. Состав среды влиял на уровень трансдукции в способе с использованием цитокинов. Фиг. 3B представляет собой пару диаграмм, на которых показаны процентные доли CD3+ CAR+ клеток в день 1 (слева) или день 8 (справа) для каждого тестируемого условия. "2,50" указывает на MOI, составляющую 2,50. "5,00" указывает на MOI, составляющую 5,00.

Фиг. 4A-4D. CAR-Т-клетки, полученные в течение 24 часов, могут обеспечивать устранение опухоли. Фиг. 4A. Очищенные Т-клетки трансдуцировали с помощью CAR для CD19 и собирали спустя 24 часа. Фиг. 4A представляет собой ряд проточно-цитометрических графиков, на которых показана трансдукция Т-клеток с помощью CAR для CD19, которые культивировали с IL2, IL15 и IL7+IL15, что иллюстрирует трансдукцию для каждого условия применения цитокинов. Фиг. 4B. Диаграмма, которая демонстрирует среднюю жизнеспособность, которая превышала 80% при всех тестируемых условиях. Фиг. 4C. Уровень размножения CART дня 1 в периферической крови является увеличенным in vivo по сравнению с их аналогами дня 10. Для каждого из тестируемых условий определяли процентную долю живых CD45+ CD11b- CD3+ CAR+ клеток в указанные моменты времени после инфузии. CART дня 10 помечены как "D10 1e6" или "D10 5e6", а все другие образцы представляли собой CART дня 1. Фиг. 4D. CART дня 1 могли обеспечивать устранение опухоли in vivo, хотя и с замедленной кинетикой по сравнению с CART дня 10. Фиг. 4D представляет собой диаграмму, на которой показан общий поток в указанные моменты времени после инокуляции опухоли для каждого тестируемого условия. CART вводили через 4 дня после инокуляции опухоли. CART дня 10 помечены как "5e6 D10", а все другие образцы представляли собой CART дня 1.

Фиг. 5A-5B. Способ с использованием цитокинов был масштабируемым. Фиг. 5A. Т-клетки обогащали на CliniMACS® Prodigy®, и B-клеточный компартмент уменьшали до менее 1%. Фиг. 5A представляет собой ряд проточно-цитометрических графиков, на которых показано окрашивание клеток антителом к CD3 (слева) или антителом к CD19 и антителом к CD14 (справа) для клеток лейкоцитарной массы (вверху) или клеток после обогащения по CD4+ и CD8+ (внизу). Фиг. 5B. Очищенные Т-клетки из замороженного образца, полученного путем афереза, трансдуцировали с помощью CAR для CD19 в 24-луночном планшете либо мешке PL30 после обогащения. CART собирали спустя 24 часа. Фиг. 5B представляет собой ряд проточно-цитометрических графиков, на которых показано окрашивание в отношении CD3 и CAR клеток, изготовленных в присутствии IL2 либо hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra).

Фиг. 6A-6C. CART, изготовленные посредством способа с использованием

активации, продемонстрировали лучшую противоопухолевую эффективность in vivo. Фиг. 6A и 6B представляют собой диаграммы, где опухолевая нагрузка отложена на графике в зависимости от указанного момента времени после имплантации опухоли. "D1" указывает на CART, изготовленные посредством способа с использованием активации. "D9" указывает на CART, изготовленные посредством традиционного протокола 9-дневного размножения, которые служат в качестве положительного контроля в данном исследовании. Фиг. 6C представляет собой ряд иллюстративных изображений, на которых показана биолюминесценция у мышей.

Фиг. 7A-7B. Обогащение клетками, экспрессирующими IL6Rα и IL6Rβ, осуществляли в популяции менее дифференцированных Т-клеток. Свежие Т-клетки окрашивали в отношении указанных поверхностных антигенов и исследовали в отношении уровней экспрессии IL6Rα и IL6Rβ в CD4 (фиг. 7A) и CD8 (фиг. 7B) субпопуляциях Т-клеток.

Фиг. 8A и 8B. Обогащение клетками, экспрессирующими как IL6Rα, так и IL6Rβ, осуществляли в популяции менее дифференцированных Т-клеток. Свежие Т-клетки окрашивали в отношении указанных поверхностных антигенов и исследовали в отношении уровней экспрессии указанных поверхностных антигенов в CD4 (фиг. 8A) и CD8 (фиг. 8B) субпопуляциях Т-клеток.

Фиг. 9. Клетки, экспрессирующие IL6Rα, экспрессировали поверхностные маркеры менее дифференцированных Т-клеток. Свежие Т-клетки окрашивали в отношении указанных поверхностных антигенов и исследовали в отношении уровней экспрессии различных поверхностных антигенов в субпопуляциях клеток, экспрессирующих IL6Rα на высоком, среднем и низком уровне.

Фиг. 10. Клетки, экспрессирующие IL6Rβ, экспрессировали поверхностные маркеры менее дифференцированных Т-клеток. Свежие Т-клетки окрашивали в отношении указанных поверхностных антигенов и исследовали в отношении уровней экспрессии различных поверхностных антигенов в субпопуляциях клеток, экспрессирующих IL6Rβ на высоком, среднем и низком уровне.

Фиг. 11. После взаимодействия TCR с его лигандом происходило подавление экспрессии IL6Rα, но не IL6Rβ. Т-клетки активировали с помощью гранул с αCD3αCD28 в день 0 и затем исследовали в отношении уровней экспрессии IL6Rα и IL6Rβ в указанные моменты времени.

Фиг. 12. Кратность размножения Т-клеток, обработанных цитокинами, после взаимодействия TCR с его лигандом. Т-клетки активировали с помощью гранул с αCD3αCD28 в день 0 в присутствии указанных цитокинов и затем отслеживали в отношении количества клеток в указанные моменты времени.

Фиг. 13A и 13B. Обработка с помощью IL2, IL7 и IL15 не влияла на размер и жизнеспособность клеток после взаимодействия TCR с его лигандом. Т-клетки активировали с помощью гранул с αCD3αCD28 в день 0 в присутствии указанных цитокинов и затем отслеживали в отношении размера (фиг. 13A) и жизнеспособности

клеток (фиг. 13B) в указанные моменты времени.

Фиг. 14. Кинетика экспрессии различных поверхностных молекул на CD4 Т-клетках после обработки цитокинами. Т-клетки активировали с помощью гранул с αCD3αCD28 в день 0 в присутствии указанных цитокинов и затем исследовали в отношении экспрессии различных поверхностных молекул с помощью проточной цитометрии в указанные моменты времени.

Фиг. 15. Кинетика экспрессии различных поверхностных молекул на CD8 Т-клетках после обработки цитокинами. Т-клетки активировали с помощью гранул с αCD3αCD28 в день 0 в присутствии указанных цитокинов и затем исследовали в отношении экспрессии различных поверхностных молекул с помощью проточной цитометрии в указанные моменты времени.

Фиг. 16. Экспрессия IL6Rβ была главным образом ограничена субпопуляциями Т-клеток, экспрессирующих CD27, после взаимодействия TCR с его лигандом. Т-клетки активировали с помощью гранул с αCD3αCD28 в день 0 в присутствии указанных цитокинов и затем исследовали в отношении экспрессии IL6Rβ с помощью проточной цитометрии в день 15.

Фиг. 17. Экспрессия IL6Rβ была главным образом ограничена субпопуляциями Т-клеток, не экспрессирующих CD57, после взаимодействия TCR с его лигандом. Т-клетки активировали с помощью гранул с αCD3αCD28 в день 0 в присутствии указанных цитокинов и затем исследовали в отношении экспрессии IL6Rβ с помощью проточной цитометрии в день 25.

Фиг. 18. Т-клетки, обработанные общей γ-цепью цитокинов, продуцировали функциональные цитокины в день 25. Т-клетки активировали с помощью гранул с αCD3αCD28 в день 0 в присутствии указанных цитокинов и затем исследовали в отношении процентных долей Т-клеток, продуцирующих IL2, IFNγ и TNFα, с помощью проточной цитометрии в день 25.

Фиг. 19A и 19B. Экспрессия CAR для BCMA в день 1 с применением ARM при MOI=2,5 в Т-клетках от двух здоровых доноров. Фиг. 19A представляет собой панель гистограмм, на которых показана экспрессия CAR для BCMA, измеренная с помощью проточной цитометрии. Фиг. 19B представляет собой таблицу, в которой перечислены реагенты/условия, применяемые в анализе методом проточной цитометрии.

Фиг. 20A, 20B и 20C. Кинетика экспрессии CAR in vitro со дня 1 по день 4 в клетках, изготовленных с применением способа ARM. CAR стабильно экспрессировались в день 3. Фиг. 20A представляет собой панель гистограмм, на которых показана экспрессия CAR в указанные моменты времени, измеренная с помощью проточной цитометрии. Фиг. 20B и 20C представляют собой диаграммы, на которых показаны соответственно % CAR+ и значения MFI с течением времени.

Фиг. 21A и 21B. Исследование с сортировкой in vivo в ксенотрансплантатной мышиной модели множественной миеломы KMS-11-luc. Каждая мышь получала 1,5E6 продукта на основе CART дня 1. Фиг. 21A представляет собой панель гистограмм, на

которых показана экспрессия CAR в CAR-T-клетках в день 1 и день 7. Фиг. 21B представляет собой диаграмму, на которой показана кинетика опухоли (уровень BLI) после обработки с помощью CART.

Фиг. 22A, 22B и 22C. Исследование с сортировкой CAR для BCMA in vivo с применением подбора дозы в ксенотрансплантатной мышиной модели множественной миеломы KMS-11-luc. Фиг. 22A представляет собой панель гистограмм, на которых показана экспрессия CAR в день 1 и день 3. Фиг. 22B представляет собой диаграмму, на которой показана кинетика поглощения опухолью после обработки с помощью CART с использованием двух разных доз: дозы 1,5e5 CAR+ T-клеток и дозы 5e4 CAR+ T-клеток. Дозы CAR+ клеток нормализовали по экспрессии CAR в день 3. Фиг. 22C представляет собой диаграмму, на которой показана кинетика массы тела на протяжении данного исследования.

Фиг. 23A, 23B и 23C. Фиг. 23A и 23B представляют собой диаграммы, на которых показаны процентная доля T-клеток, экспрессирующих CAR на своей клеточной поверхности (фиг. 23A), и средняя интенсивность флуоресценции (MFI) CD3+ CAR+ клеток (фиг. 23B), наблюдаемые с течением времени (показатели эффективности в повторностях усреднены из двух проточно-цитометрических панелей, показанных на фиг. 23C). Фиг. 23C представляет собой панель проточно-цитометрических графиков, на которых показана стратегия гейтирования для определения поверхностной экспрессии CAR на жизнеспособных CD3+ клетках, исходя из UTD образцов. Числами на графике указан процент CAR-положительных клеток.

Фиг. 24A и 24B. Фиг. 24A представляет собой диаграмму, на которой показан полный состав исходного материала (продукт Prodigy®) и при сборе в различные моменты времени после начала культивирования. Субпопуляции необученных клеток (n), центральных клеток памяти (cm), эффекторных клеток памяти (em) и эффекторных клеток (eff) определяли по поверхностной экспрессии CD4, CD8, CCR7 и CD45RO или отсутствию таковой. Указан состав CD4. Для каждого момента времени в левом столбце показан клеточный состав в общей CD3+ популяции (смешанной популяции), а в правом столбце показан клеточный состав в CAR+ фракции. Фиг. 24B представляет собой панель проточно-цитометрических графиков, на которых показана применяемая стратегия гейтирования по живым CD3+ объектам для определения общей эффективности трансдукции (верхний ряд), состава CD4/CD8 (средний ряд) и субпопуляций клеток памяти (нижний ряд) в пределах CD3+ популяции (смешанная популяция) и CAR+ фракции.

Фиг. 25. Кинетика субпопуляций T-клеток, экспрессирующих CAR на поверхности, с течением времени, выраженная в виде количества жизнеспособных клеток в соответствующих субпопуляциях.

Фиг. 26. Выход жизнеспособных клеток (количество жизнеспособных клеток, полученных на выходе при сборе, по сравнению с количеством высеянных жизнеспособных клеток) через 12-24 часа после начала культивирования согласно

определению при подсчетах перед промыванием.

Фиг. 27. Жизнеспособность CART, полученных посредством способа быстрого изготовления, собранных через 12-24 часа после начала культивирования, согласно определению перед промыванием и после промывания во время сбора.

Фиг. 28A, 28B, 28C и 28D. Фиг. 28A представляет собой диаграмму, на которой показан состав исходного материала (лейкоцитарная масса от здорового донора; LKPK) и продукта, обогащенного Т-клетками, согласно анализу методом проточной цитометрии. Числами указан % исходных (живых, одиночных клеток). T: Т-клетки; моно: моноциты; B: B-клетки; CD56 (NK): NK-клетки. Фиг. 28B представляет собой панель проточно-цитометрических графиков, на которых показана стратегия гейтирования по живым CD3+ объектам, применяемая для определения показателя трансдукции (прямое светорассеяние FSC в сравнении с CAR) и субпопуляций Т-клеток (CD4 в сравнении с CD8 и CCR7 в сравнении с CD45RO). Для ARM-CAR для CD19 (CD19-CAR-T-клеток, изготовленных с применением способа быстрого изготовления с активацией (ARM)) и TM-CAR для CD19 (CD19-CAR-T-клеток, изготовленных с применением способа традиционного изготовления (TM)), левые нижние панели представляют смешанные культуры, тогда как правые панели представляют CAR+ Т-клетки. "ARM-UTD" и "TM-UTD" относятся к нетрансдуцированным Т-клеткам (UTD), изготовленным согласно способам ARM и TM соответственно. Числами в квадрантах указан % от исходной популяции. Рамками на графиках для TM-UTD и TM-CAR для CD19 указано смещение к фенотипу T_{CM} в способе TM. Рамками на графиках для ARM-UTD и ARM-CAR для CD19 указано сохранение клеток, подобных необученным, при применении способа ARM. NA: не применимо. Фиг. 28C представляет собой диаграмму, на которой показан полный Т-клеточный состав для ARM-CAR для CD19 и TM-CAR для CD19. Состав показан для "смешанной" и "CAR+" популяций там, где это применимо. Процентная доля соответствующих популяций относится к % CD3+ либо CAR+ CD3+ от исходной популяции, если это применимо. Указан % CD4 клеток в соответствующей смешанной или CAR+ популяции. LKPK: исходный материал в виде лейкоцитарной массы; 4 и 8: CD4+ и CD8+ соответственно; eff: эффекторные клетки; em: эффекторные клетки памяти; cm: центральные клетки памяти; n: клетки, подобные необученным. Данные иллюстрируют 3 полномасштабных цикла с 3 разными здоровыми донорами (n= 3) и несколько мелкомасштабных циклов, которые применяли для оптимизации способа. Фиг. 28D представляет собой таблицу, в которой показаны процентные доли, показанные на фиг. 28C.

Фиг. 29A, 29B, 29C и 29D. Концентрация цитокинов в образцах надосадочной жидкости культуры клеток. IFN-γ (фиг. 29A и 29B) и IL-2 (фиг. 29C и 29D). Фиг. 29A и 29C. TM-CAR для CD19, ARM-CAR для CD19 и соответствующие UTD объекты культивировали совместно с NALM6-WT (ALL), TMD-8 (DLBCL) или без раковых клеток (Т-клетки в отдельности). Надосадочную жидкость собирали спустя 48 ч. Фиг. 29B и 29D. ARM-CAR для CD19 культивировали совместно с NALM6-WT, NALM6-19KO (CD19-отрицательными) или в отдельности. Надосадочную жидкость собирали через 24 ч. или 48

ч. Для дополнительной оценки антигенспецифической секреции цитокинов ARM-CAR для CD19 культивировали в отдельности в течение 24 ч., промывали и затем культивировали совместно с клетками-мишенями в течение 24 ч. Показанные данные получены для Т-клеток 2 здоровых доноров, и они иллюстрируют 2 эксперимента в общей сложности с тремя донорами.

Фиг. 30A, 30B и 30C. Фиг. 30A представляет собой диаграмму, на которой в общих чертах описана ксенотрансплантатная мышиная модель для изучения противоопухолевой активности ARM-CAR для CD19. Фиг. 30B представляет собой панель проточно-цитометрических графиков, на которых показано определение экспрессии CAR на клетках с ARM-CAR для CD19 из сигнального флакона. Клетки с ARM-CAR для CD19 культивировали в течение периода времени, описанного на фигуре, перед анализом методом проточной цитометрии. Гейтирование для определения экспрессии CAR проводили, исходя из окрашивания изотипического контроля (Iso). Фиг. 30C представляет собой диаграмму, на которой показана эффективность ARM-CAR для CD19 in vivo в ксенотрансплантатной мышиной модели. Мышам NSG инъецировали линию клеток пре-B-клеточного ALL NALM6, которые экспрессировали репортерный ген люциферазы; опухолевая нагрузка выражена в виде люминесценции всего тела (фотонов/с), изображенной в виде средней опухолевой нагрузки с 95% доверительным интервалом. В день 7 после инокуляции опухоли мышей обрабатывали с помощью ARM-CAR для CD19 или TM-CAR для CD19 в соответствующих дозах (количество жизнеспособных CAR+ Т-клеток). Исследование группы ARM-CAR для CD19 в высокой дозе прекращали в день 33 из-за начала X-GVHD. Среда-носитель (PBS) и нетрансдуцированные Т-клетки (UTD) служили в качестве отрицательных контролей. Количество мышей составляло n=5 для всех групп, кроме n=4 для дозовой группы 1×10^6 ARM-UTD и всех дозовых групп TM-CAR для CD19. Пять исследований с ксенотрансплантацией проводили с CAR-Т-клетками, полученными от 5 разных здоровых доноров, три из которых включали сравнение с TM-CAR для CD19.

Фиг. 31A, 31B, 31C и 31D. Уровни цитокинов в плазме крови у мышей, несущих опухоль из NALM6, обработанных с помощью ARM-CAR для CD19 или TM-CAR для CD19 при соответствующих дозах CAR-Т-клеток. У мышей отбирали кровь, и уровень цитокинов в плазме крови измеряли с помощью MSD-анализа. IFN-γ (фиг. 31A и 31B) и IL-2 (фиг. 31C и 31D) показаны для мышей, обработанных с помощью CART (фиг. 31A и 31C) или ARM- и TM-UTD клеток (фиг. 31B и 31D). Столбцы в пределах каждой из доз представляют средний уровень цитокинов в пределах группы в различные моменты времени (начиная слева: день 4, 7, 10, 12, 16, 19, 23, 26). Горизонтальными столбцами и числами указана кратность изменения при сравнении ARM-CAR для CD19 (дозовая группа 1×10^6) и TM-CAR для CD19 (дозовая группа $0{,}5\times10^6$), описанное в тексте: 3-кратное для IFN-γ и 10-кратное для IL-2. Для групп, исключенных из эксперимента из-за опухолевой нагрузки или потери массы тела, последние моменты времени не показаны. Уровни цитокинов в плазме крови измеряли для 2 исследований. опух. отсутств.: опухоль

отсутствует.

Фиг. 32. Динамика концентраций общей популяции и CAR+ Т-клеток у мышей, несущих опухоль из NALM6, обработанных средой-носителем, представляющей собой PBS, UTD, TM-CAR для CD19 или ARM-CAR для CD19. Образцы крови отбирали в день 4, 7, 14, 21 и 28 после инъекции CAR-Т-клеток. Концентрации общей популяции Т-клеток (CD3+, сверху) и CAR+ Т-клеток (CD3+ CAR+, снизу) анализировали с помощью проточной цитометрии в установленные моменты времени, и они изображены в виде среднего количества клеток с 95% доверительным интервалом.

Фиг. 33A и 33B. Уровни белка IL-6 в образцах надосадочной жидкости трехкомпонентной совместной культуры в пг/мл. Совместно культивируемые клетки ARM-CAR для CD19/K562 (фиг. 33A) или совместно культивируемые клетки TM-CAR для CD19/K562 (фиг. 33B), инкубируемые в течение 6 или 24 часов при различных соотношениях (1:1 и 1:2,5), затем добавляли к клеткам THP-1, дифференцированным под действием PMA, еще на 24 часа. Показаны результаты для CAR-Т-клеток, совместно культивируемых с клетками K562-CD19, CAR-Т-клеток, совместно культивируемых с клетками K562, экспрессирующими мезотелин, и CAR-Т-клеток в отдельности. Соотношения 1:5 не показаны для ясности. Столбцы, обозначенные ARM-CAR для CD19 отдельно и TM-CAR для CD19 отдельно, представляют культуры CAR-Т-клеток (6 ч., 24 ч.) без клеток-мишеней. Среднее значение+SEM, повторности n=1 (TM-CAR для CD19) и n=3 (ARM-CAR для CD19).

Фиг. 34A, 34B и 34C. Способ ARM обеспечивает сохранение стволовости у BCMA-CAR+ Т-клеток. CAR-Т-клетки PI61, R1G5 и BCMA10, изготовленные с применением способа ARM, оценивали в отношении экспрессии CAR при размораживании (фиг. 34A) и через 48 ч. после размораживания (фиг. 34B). Также оценивали маркеры CCR7/CD45RO в продукте через 48 ч. после размораживания (фиг. 34C). Показанные данные иллюстрируют два эксперимента, проведенных с использованием Т-клеток от двух доноров.

Фиг. 35A и 35B. Способ TM приводил к получению главным образом центральных Т-клеток памяти (TCM) (CD45RO+/CCR7+), тогда как популяция Т-клеток, подобных необученным, практически исчезала среди CAR+ Т-клеток при применении способа TM. CAR-Т-клетки PI61, R1G5 и BCMA10, изготовленные с применением способа TM, оценивали в отношении экспрессии CAR в день 9 (фиг. 35A). Также оценивали маркеры CCR7/CD45RO в продукте в день 9 после размораживания (фиг. 35B). Показанные данные иллюстрируют два эксперимента, проведенных с использованием Т-клеток от двух доноров.

Фиг. 36A, 36B, 36C и 36D. BCMA-CAR-Т-клетки, полученные посредством способа ARM, демонстрируют BCMA-специфическую активацию и секретируют IL2 и IFN-γ на более высоких уровнях. Концентрации IL-2 и IFN-γ в образцах надосадочной жидкости культуры клеток. CAR-Т-клетки PI61, R1G5 и BCMA10, изготовленные с применением способа ARM или TM, и соответствующие UTD совместно культивировали

с KMS-11 при соотношении 2,5:1. Образцы надосадочной жидкости собирали спустя 20 ч. Для продуктов, полученных посредством способа ARM, концентрации IFN-γ показаны на фиг. 36A, а концентрации IL-2 показаны на фиг. 36B. Для продуктов, полученных посредством способа TM, концентрации IFN-γ показаны на фиг. 36C, а концентрации IL-2 показаны на фиг. 36D. Показанные данные иллюстрируют два эксперимента, проведенных с использованием Т-клеток от двух доноров.

Фиг. 37A, 37B и 37C. Данные секвенирования РНК одиночных клеток для исходных клеток (фиг. 37A), клеток дня 1 (фиг. 37B) и клеток дня 9 (фиг. 37C). Диаграммы "n генов" демонстрируют количество экспрессируемых генов на клетку. Диаграммы "n UMI" демонстрируют количество уникальных молекулярных идентификаторов (UMI) на клетку.

Фиг. 38A, 38B, 38C и 38D. Графики, построенные методом нелинейного снижения размерности и визуализации многомерных переменных (TSNE), на которых сравниваются исходные клетки (фиг. 38A), клетки дня 1 (фиг. 38B) и клетки дня 9 (фиг. 38C) в отношении сигнатуры пролиферации, которую определяли на основании экспрессии генов CCNB1, CCND1, CCNE1, PLK1 и MKI67. Каждая точка представляет собой клетку в рассматриваемом образце. Клетки, показанные светло-серым цветом, не экспрессируют гены, отвечающие за пролиферацию, тогда как клетки, заштрихованные темным цветом, экспрессируют один или несколько генов, отвечающих за пролиферацию. Фиг. 38D представляет собой скрипичный график, на котором показано распределение баллов набора генов для набора генов, состоящего из генов, которые характеризуют покоящееся состояние Т-клеток, относительно таковых, которые характеризуют активированное состояние Т-клеток, для клеток дня 1, клеток дня 9 и исходных клеток. На фиг. 38D более высокий балл набора генов (активируемые в покоящемся состоянии относительно подавляемых в активированном состоянии) указывает на увеличение выраженности фенотипа покоящихся Т-клеток, тогда как более низкий балл набора генов (активируемые в покоящемся состоянии относительно подавляемых в активированном состоянии) указывает на увеличение выраженности фенотипа активированных Т-клеток. Исходные клетки в целом были в большинстве своем в покоящемся состоянии по сравнению с клетками дня 9 и дня 1. Клетки дня 1 демонстрируют наиболее высокий балл набора генов, отвечающих за активацию.

Фиг. 39A, 39B, 39C, 39D и 39E. Анализ наборов генов для исходных клеток, клеток дня 1 и клеток дня 9. На фиг. 39A более высокий балл набора генов для набора генов "активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM" указывает на увеличение выраженности фенотипа эффекторных Т-клеток памяти (TEM) в рассматриваемом образце, тогда как более низкий балл набора генов указывает на увеличение выраженности фенотипа стволовых Т-клеток памяти (TSCM). На фиг. 39B более высокий балл набора генов для набора генов "активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff" указывает на увеличение выраженности фенотипа регуляторных Т-клеток (Treg), тогда как более низкий балл набора генов указывает на увеличение

выраженности фенотипа эффекторных Т-клеток (Teff). На фиг. 39C более низкий балл набора генов для набора генов "подавляемые в состоянии стволовости" указывает на увеличение выраженности фенотипа стволовости. На фиг. 39D более высокий балл набора генов для набора генов "активируемые при гипоксии" указывает на увеличение выраженности фенотипа, характерного для гипоксии. На фиг. 39E более высокий балл набора генов для набора генов "активируемые при аутофагии" указывает на увеличение выраженности фенотипа, характерного для аутофагии. Клетки дня 1 выглядели похожими на исходные клетки в отношении сигнатуры памяти, подобия стволовым клеткам и дифференцировки. Клетки дня 9 в то же время демонстрируют более высокую степень выраженности метаболического стресса.

Фиг. 40A, 40B и 40C. Анализ генов в кластерах исходных клеток. Фиг. 40A-40C представляют собой скрипичные графики, на которых показаны баллы наборов генов из анализа наборов генов в четырех кластерах исходных клеток. Каждая точка, лежащая на скрипичных графиках на фиг. 40A-40C, представляет балл набора генов в клетке. На фиг. 40A более высокий балл набора генов для набора генов "активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff" указывает на увеличение выраженности фенотипа Treg-клеток, тогда как более низкий балл набора генов для набора генов "активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff" указывает на увеличение выраженности фенотипа Teff-клеток. На фиг. 40B более высокий балл набора генов для набора генов "постепенно активируемые при дифференцировке в клетки памяти" указывает на увеличение выраженности фенотипа поздних Т-клеток памяти, тогда как более низкий балл набора генов для набора генов "постепенно активируемые при дифференцировке в клетки памяти" указывает на увеличение выраженности фенотипа ранних Т-клеток памяти. На фиг. 40C более высокий балл набора генов для набора генов "активируемые в TEM относительно подавляемых в TN" указывает на увеличение выраженности фенотипа эффекторных Т-клеток памяти, тогда как более низкий балл набора генов для набора генов "активируемые в TEM относительно подавляемых в TN" указывает на увеличение выраженности фенотипа необученных Т-клеток памяти. Показано, что клетки в кластере 3 находились в состоянии поздних, более дифференцированных Т-клеток памяти по сравнению с клетками в кластере 1 и кластере 2, которые находились в состоянии ранних, менее дифференцированных Т-клеток памяти. Кластер 0, по-видимому, соответствует промежуточному состоянию Т-клеток. Взятые вместе, эти данные демонстрируют, что среди исходных клеток имеется значительный уровень гетерогенности.

Фиг. 41A, 41B и 41C. Секвенирование TCR и измерение разнообразия клонотипов. Клетки дня 9 характеризовались более плосковершинным распределением частот клонотипов (более высоким разнообразием).

Фиг. 42 представляет собой блок-схему, на которой показан план тестирования в клиническом испытании фазы I с BCMA-CAR-Т-клетками, изготовленными с применением способа ARM, у взрослых пациентов с рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломой.

Фиг. 43 представляет собой диаграмму, на которой показаны анализы методом FACS в отношении экспрессии ARM-CAR для BCMA в разные моменты времени сбора после добавления вируса в присутствии или при отсутствии AZT в двух разных концентрациях (30 мкМ и 100 мкМ). Добавляли лентивирусный вектор спустя 1 ч. перед обработкой с помощью AZT в момент активации и посева клеток.

Фиг. 44A и 44B представляют собой диаграммы, на которых показана оценка ARM-CAR для BCMA в отношении экспрессии CAR при размораживании (фиг. 44A) и через 48 ч. после размораживания, а также маркеров CCR7/CD45RO в продукте через 48 ч. после размораживания, а также в день 9 для TM-CAR для BCMA (фиг. 44B). Показанные данные иллюстрируют два эксперимента, проведенных с использованием Т-клеток от двух доноров.

Фиг. 45A и 45B представляют собой диаграммы, на которых показаны концентрации цитокинов в образцах надосадочной жидкости культуры клеток. ARM-CAR для BCMA и TM-CAR для BCMA и соответствующие UTD культивировали совместно с KMS-11. Надосадочную жидкость собирали спустя 24 ч. Показанные данные иллюстрируют два эксперимента, проведенных с использованием Т-клеток от двух доноров.

Фиг. 46 представляет собой диаграмму, на которой показано описанное в общих чертах исследование эффективности с ксенотрансплантацией для тестирования ARM-BCMA.

Фиг. 47 представляет собой диаграмму, на которой эффективность ARM-CAR для BCMA сравнивается с эффективностью TM-CAR для BCMA в ксенотрансплантатной модели. Мышам NSG инъецировали линию клеток MM KMS11, которые экспрессировали репортерный ген люциферазы. Опухолевая нагрузка выражена в виде люминесценции всего тела (фотонов/с) и изображена в виде среднего значения опухолевой нагрузки+SEM. В день 8 после инокуляции опухоли мышей обрабатывали с помощью ARM-CAR для BCMA или TM-CAR для BCMA в соответствующих дозах (количество жизнеспособных CAR+ Т-клеток). Среда-носитель (PBS) и UTD Т-клетки служили в качестве отрицательных контролей. Количество мышей составляло n=5 для всех групп, кроме n=4 для групп ARM-CAR для BCMA (1e4 клеток), PBS и UTD.

Фиг. 48A, 48B и 48C представляют собой диаграммы, на которых показана кинетика IFN-γ в плазме крови мышей, обработанных с помощью ARM-CAR для BCMA или TM-CAR для BCMA. Уровни IFN-γ в плазме крови у мышей, несущих опухоль из KMS11-luc, обработанных с помощью UTD, ARM-CAR для CD19 или TM-CAR для CD19 при соответствующих дозах CART. Все уровни IFN-γ изображены в виде среднего значения ± SEM. У мышей отбирали кровь, и уровень цитокинов в плазме крови измеряли с помощью анализа на Meso Scale Discovery (MSD).

Фиг. 49 представляет собой диаграмму, на которой показана клеточная кинетика ARM-CAR для BCMA и TM-CAR для BCMA in vivo. Клеточная кинетика в периферической крови мышей, несущих опухоль из KMS11, обработанных с помощью

TM UTD, ARM UTD, ARM-CAR для BCMA и TM-CAR для BCMA при разных дозах. Число клеток выражено в виде среднего числа клеток+SD. В день 8 после инокуляции опухоли мышей обрабатывали с помощью ARM-CAR для BCMA или TM-CAR для BCMA в соответствующих дозах (количество жизнеспособных CAR+ Т-клеток). Среда-носитель (PBS) и UTD Т-клетки служили в качестве отрицательных контролей. Образцы крови отбирали через 7, 14 и 21 день после инъекции CART и анализировали с помощью проточной цитометрии в установленные моменты времени. Количество мышей составляло n=5 для всех групп, кроме n=4 для групп ARM-CAR для BCMA (1e4 клеток), PBS и UTD.

На фиг. 50A-C представлена иллюстративная схема для биспецифических антител, включающая схему одиночного биспецифического антитела (фиг. 50A), схему мультимерного биспецифического антитела (фиг. 50B) и условные обозначения к фигуре (фиг. 50C).

На фиг. 51A-B изображена схема 17 различных конструкций, содержащих антигенсвязывающий домен для CD3, содержащий тяжелую и легкую цепи, полученные из антитела к CD3, и, во всех конструкциях, кроме контрольных конструкций 11, 14 и 17, антигенсвязывающий домен для CD28 или CD2, как указано, содержащий тяжелую и легкую цепи, полученные из антитела к CD28 или CD2 соответственно.

Конструкция 1 содержит scFv для CD3, слитый с Fab для CD2, который дополнительно слит с Fc-областью. Конструкция 1 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD2. Конструкция 2 содержит scFv для CD3, слитый с Fab для CD28, который дополнительно слит с Fc-областью. Конструкция 2 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD28.

Конструкция 3 содержит Fab для CD2, слитый с Fc-областью, которая дополнительно слита с scFv для CD3. Конструкция 3 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2, CH3 антитела к CD2, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3. Конструкция 4 содержит Fab для CD28, слитый с Fc-областью, которая дополнительно слита с scFv для CD3. Конструкция 4 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2, CH3 антитела к CD28, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3.

Конструкция 5 содержит Fab для CD2, слитый с scFv для CD3, который дополнительно слит с Fc-областью. Конструкция 5 содержит первую цепь и вторую цепь.

Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1 антитела к CD2, линкер (G4S)2 (SEQ ID NO: 5), VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), CH2 и CH3. Конструкция 6 содержит Fab для CD28, слитый с scFv для CD3, который дополнительно слит с Fc-областью. Конструкция 6 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1 антитела к CD28, линкер (G4S)2 (SEQ ID NO: 5), VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), CH2 и CH3.

Конструкция 7 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью, которая дополнительно слита с Fab для CD2. Конструкция 7 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2, CH3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VH и CH1 антитела к CD2. Конструкция 8 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью, которая дополнительно слита с Fab для CD28. Конструкция 8 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2, CH3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VH и CH1 антитела к CD28.

Конструкция 9 содержит Fab для CD2, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 9 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD2. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2 и CH3. Конструкция 10 содержит Fab для CD28, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 10 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD28. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2 и CH3.

Конструкция 11 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью. Конструкция 11 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу CH2 и CH3. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2 и CH3.

Конструкция 12 содержит Fab для CD2, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 12 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD2. Третья

цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2, CH3, линкер (G4S)3 (SEQ ID NO: 104) и матрилин 1. Конструкция 13 содержит Fab для CD28, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 13 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD28. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2, CH3, линкер (G4S)3 (SEQ ID NO: 104) и матрилин 1.

Конструкция 14 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью. Конструкция 14 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу CH2 и CH3. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2, CH3, линкер (G4S)3 (SEQ ID NO: 104) и матрилин 1.

Конструкция 15 содержит Fab для CD2, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 15 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD2. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2, CH3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25) и суперспиральный домен олигомерного матриксного белка хряща (COMPcc). Конструкция 16 содержит Fab для CD28, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 16 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD28. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2, CH3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25) и COMPcc.

Конструкция 17 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью. Конструкция 17 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу CH2 и CH3. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 63), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25), CH2, CH3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 25) и COMPcc.

На фиг. 52 представлены изображения Т-клеток, полученные методом светлопольной микроскопии, в день 4 после применения 10 мкг/мл конструкций и положительного контроля. Числа в верхнем левом углу каждого изображения относятся к названию тестируемых конструкций. Например, "1" относится к конструкции 1, "2" относится к конструкции 2 и т. д. и т. п. "TA" означает TransAct.

На фиг. 53 показаны результаты по считываемым показателям IFN-гамма и IL-2 в MSD для каждой из 17 конструкций и TransAct. Числа по оси x относятся к названию

тестируемых конструкций. Например, "1" относится к конструкции 1, "2" относится к конструкции 2 и т. д. и т. п. "TA" означает TransAct.

На фиг. 54 показан процент трансдукции с помощью CAR для CD19 для каждой из 17 конструкций и TransAct. Числа по оси x относятся к названию тестируемых конструкций. Например, "1" относится к конструкции 1, "2" относится к конструкции 2 и т. д. и т. п. "TA" означает TransAct.

На фиг. 55 изображена трансдукция с помощью CAR в зависимости от валентности или костимулирующей молекулы, на которую происходит нацеливание (CD2/CD28). На фиг. 55 F1, F2, F3, F4, F5 и F7 имеют валентность по отношению к лигандам, составляющую 2; F12 и F13 имеют валентность по отношению к лигандам, составляющую 3; а F15 и F16 имеют валентность по отношению к лигандам, составляющую 5. F1, F3, F5, F7, F12 и F15 связываются с CD2, тогда как F2, F4, F13 и F16 связываются с CD28.

На фиг. 56A-56D показано специфичное уничтожение опухолевых клеток (рассчитанное путем вычитания среднего % уничтожения клеток Nalm6 CD19KO из среднего % уничтожения клеток Nalm6 WT) для CAR-T-клеток, полученных с использованием конструкций 1 (F1), 3 (F3), 4 (F4), 5 (F5) в сравнении с TransAct ("TA"). "H" (в "3H" и "5H") указывает на концентрацию антитела, составляющую 10 мкг/мл; "M" (в "1M", "3M", "4M" и "5M") указывает на концентрацию антитела, составляющую 1 мкг/мл; и "L" (в "1L", "3L", "4L" и "5L") указывает на концентрацию антитела, составляющую 0,1 мкг/мл.

На фиг. 57A-B показаны уровни цитокинов, секретируемых CAR-T-клетками, полученными с использованием конструкций 1 (F1), 3 (F3), 4 (F4) или 5 (F5) или TransAct, при совместном культивировании с клетками Nalm6 WT ("ARM против Nalm6 WT") или клетками Nalm6 с нокаутом CD19 ("ARM против Nalm6 CD19 KO").

На фиг. 58 показана опухолевая нагрузка в зависимости от времени в ксенотрансплантатной мышиной модели Nalm6 при обработке трансдуцированными CAR или нетрансдуцированными клетками от обоих доноров.

На фиг. 59 показаны значения числа CAR+ и CD3+ клеток (на 20 мкл) у мышей, обработанных трансдуцированными CAR или нетрансдуцированными клетками от обоих доноров. Эти значения числа получали из образцов крови недели 2, подвергнутых анализу методом FACS.

На фиг. 60A-60D показаны противоопухолевая активность (фиг. 60A-60B) и размножение CAR in vivo (фиг. 60C-60D) по донорам.

На фиг. 61A-61B показаны информация о связывании (фиг. 61A) и конфигурация (фиг. 61B) стимулирующих конструкций второго поколения. "F5 на основе антитела к CD3 (2)" относится к конструкции F5 с CD3-связывающим средством на основе антитела к CD3 (2).

На фиг. 62 показана эффективность трансдукции для различных стимулирующих конструкций, в том числе показанных на фиг. 61A. "TA" означает TransAct. TransAct

применяли в количестве 0,1% по объему (1 мкл на каждые 1000 мкл культуры).

На фиг. 63A-63B показаны информация о связывании (фиг. 63A) и конфигурация (фиг. 63B) стимулирующих конструкций третьего поколения.

На фиг. 64 показана эффективность трансдукции для различных стимулирующих конструкций, в том числе показанных на фиг. 63A. "TA" означает TransAct.

На фиг. 65A и 65B показано специфическое уничтожение клеток Nalm6 (фиг. 65A) и неспецифическое уничтожение клеток PL21, несущих FcγR (фиг. 65B). "F3 с сайленсингом Fc" относится к NEG2042, и "F4 с сайленсингом Fc" относится к NEG2043 на фиг. 63A.

Фиг. 66A и 66B. На фиг. 66A показаны процентные доли Т-клеток, экспрессирующих CAR для CD19 ("CAR19+"; вверху), CAR для BCMA ("BCMA+"; посредине) или совместно экспрессирующих оба CAR ("BCMA+ CAR19+"; внизу) после котрансдукции двумя векторами. На фиг. 66B показаны процентные доли Т-клеток, экспрессирующих CAR для CD22 ("CAR22+") или совместно экспрессирующих CAR для CD19 и CAR для CD22 ("CAR19+22+") после трансдукции вектором, кодирующим двойной CAR, определенные в два разных момента времени после изготовления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Форма единственного числа относится к одному или нескольким (т. е. по меньшей мере одному) грамматическим объектам настоящей заявки. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или несколько элементов.

Подразумевается, что термин "приблизительно" в отношении измеряемой величины, такой как количество, временной промежуток и т. п., охватывает отклонения на ± 20%, или в некоторых случаях на ± 10%, или в некоторых случаях на ± 5%, или в некоторых случаях на ± 1%, или в некоторых случаях на ± 0,1% от указанного значения, поскольку такие отклонения являются допустимыми для осуществления раскрытых способов.

Композиции и способы по настоящему изобретению охватывают полипептиды и нуклеиновые кислоты, имеющие указанные последовательности или последовательности, по существу идентичные им или сходные с ними, например, последовательности, идентичные указанной последовательности на по меньшей мере 85%, 90% или 95% или больше. Применительно к аминокислотной последовательности термин "по существу идентичная" используется в данном документе для обозначения первой аминокислотной последовательности, которая содержит достаточное или минимальное количество аминокислотных остатков, которые i) идентичны аминокислотным остаткам во второй аминокислотной последовательности после их выравнивания или ii) являются их консервативными заменами, так что первая и вторая аминокислотные последовательности

могут иметь общий структурный домен и/или характеризоваться общей функциональной активностью, например, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный домен, характеризуются по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с эталонной последовательностью, например, последовательностью, представленной в данном документе.

Применительно к нуклеотидной последовательности термин "по существу идентичная" используется в данном документе для обозначения первой последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит достаточное или минимальное количество нуклеотидов, которые идентичны нуклеотидам во второй последовательности нуклеиновой кислоты после их выравнивания, так что первая и вторая нуклеотидные последовательности кодируют полипептиды, характеризующиеся общей функциональной активностью, или кодируют общий структурный домен полипептидов или отвечают за общую функциональную активность полипептидов, например, нуклеотидные последовательности характеризуются по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с эталонной последовательностью, например, последовательностью, представленной в данном документе.

Термин "вариант" относится к полипептиду, который имеет аминокислотную последовательность, по существу идентичную эталонной аминокислотной последовательности, или кодируется по существу идентичной нуклеотидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления вариант представляет собой функциональный вариант.

Термин "функциональный вариант" относится к полипептиду, который имеет аминокислотную последовательность, по существу идентичную эталонной аминокислотной последовательности, или кодируется по существу идентичной нуклеотидной последовательностью и способен характеризоваться одним или несколькими видами активности эталонной аминокислотной последовательности.

Термин "цитокин" (например, IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 или IL-6) включает полноразмерный встречающийся в природе цитокин, его фрагмент или вариант, например, функциональный вариант (в том числе его фрагменты и функциональные варианты, характеризующиеся по меньшей мере 10%, 30%, 50% или 80% активности, например, иммуномодулирующей активности, встречающегося в природе цитокина). В некоторых вариантах осуществления цитокин имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична (например, идентична на по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) встречающемуся в природе цитокину или кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по существу идентична (например, идентична на по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) встречающейся в природе нуклеотидной последовательности, кодирующей

цитокин. В некоторых вариантах осуществления, как понятно из контекста, цитокин дополнительно содержит рецепторный домен, например, домен, представляющий собой рецептор цитокина (например, IL-15/IL-15R).

Термин "химерный антигенный рецептор" или в качестве альтернативы "CAR" относится к рекомбинантной полипептидной конструкции, содержащей по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый в данном документе "внутриклеточным сигнальным доменом"), содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, определенной ниже. В некоторых вариантах осуществления домены в полипептидной конструкции CAR находятся в одной и той же полипептидной цепи, например, образуют химерный слитый белок. В некоторых вариантах осуществления домены в полипептидной конструкции CAR не являются смежными друг с другом, например, находятся в разных полипептидных цепях, например, как представлено в RCAR, описанном в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен (например, первичный сигнальный домен CD3-дзета). В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, определенной ниже. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула выбрана из 4-1BB (т. е. CD137), CD27, ICOS и/или CD28. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит необязательную лидерную последовательность на амино-конце (N-конце) слитого белка

CAR. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит лидерную последовательность на N-конце внеклеточного антигенраспознающего домена, где лидерная последовательность необязательно отщепляется от антигенраспознающего домена (например, scFv) в ходе клеточного процессинга и локализации CAR в клеточной мембране.

CAR, содержащий антигенсвязывающий домен (например, scFv, однодоменное антитело или TCR (например, связывающий домен альфа-цепи TCR или связывающий домен бета-цепи TCR)), который нацеливается на конкретный опухолевый маркер X, где X может быть опухолевым маркером, описанным в данном документе, также называется XCAR. Например, CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, нацеливающийся на BCMA, называется CAR для BCMA. CAR может экспрессироваться в любой клетке, например, иммунной эффекторной клетке, описанной в данном документе (например, Т-клетке или NK-клетке).

Термин "сигнальный домен" относится к функциональной части белка, которая действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности посредством определенных сигнальных путей, образуя вторичные мессенджеры или функционируя в качестве эффекторов путем ответа на такие мессенджеры.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к последовательности белка или полипептида, полученной из молекулы иммуноглобулина, который специфично связывается с антигеном. Антитела могут являться поликлональными или моноклональными, многоцепочечными или одноцепочечными или интактными иммуноглобулинами и могут быть получены из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут являться тетрамерными молекулами иммуноглобулинов.

Термин "фрагмент антитела" относится к по меньшей мере одной части интактного антитела или его рекомбинантных вариантов и относится к антигенсвязывающему домену, например, антигенраспознающей вариабельной области интактного антитела, достаточной для обеспечения распознавания и специфичного связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген. Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fab-, Fab'-, F(ab')2- и Fv-фрагменты, scFv-фрагменты антител, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (либо VL, либо VH), VHH-домены верблюдовых и полиспецифические молекулы, образованные из фрагментов антител, такие как бивалентный фрагмент, содержащий два или более, например, два, Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, или две или более, например, две, связанные выделенные CDR или другие эпитопсвязывающие фрагменты антитела. Фрагмент антитела также может быть включен в состав однодоменных антител, максиантител, миниантител, нанотел, интрател, диател, триател, тетрател, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Фрагменты антитела также могут быть пересажены на каркасные структуры на основе

полипептидов, таких как фибронектин III типа (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны миниантитела на основе полипептида фибронектина).

Термин "scFv" относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, где вариабельные области легкой и тяжелой цепи связаны друг с другом в смежном положении посредством короткого гибкого полипептидного линкера и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, и где scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, то scFv, как используется в данном документе, может иметь вариабельные VL- и VH-области, расположенные в любом порядке, например, относительно N-конца и C-конца полипептида scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL. В некоторых вариантах осуществления scFv может содержать структуру NH_2-V_L-линкер-V_H-COOH или NH_2-V_H-линкер-V_L-COOH.

Термины "область, определяющая комплементарность" или "CDR", используемые в данном документе, относятся к последовательностям из аминокислот в вариабельных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и аффинность связывания. Например, как правило, в каждой вариабельной области тяжелой цепи находятся три CDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и в каждой вариабельной области легкой цепи находятся три CDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3). Точные границы в аминокислотной последовательности для данного CDR могут быть определены с помощью любой из широко известных схем, в том числе тех, которые описаны в Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "по Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (схема нумерации "по Chothia"), или их комбинации. Согласно комбинированной схеме нумерации по Kabat и Chothia в некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют аминокислотным остаткам, которые являются частью CDR по Kabat, CDR по Chothia или как тех, так и других.

Часть композиции на основе CAR по настоящему изобретению, предусматривающая соответствующее антитело или фрагмент антитела, может существовать в различных формах, например, в которых антигенсвязывающий домен экспрессируется в виде части полипептидной цепи, в том числе, например, в виде фрагмента однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного антитела (scFv) или, например, человеческого или гуманизированного антитела (Harlow et al., 1999, в: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, в: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен в композиции на основе CAR по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит фрагмент антитела, который содержит scFv.

Используемый в данном документе термин "связывающий домен" или "молекула антитела" (также называемые в данном документе связывающим доменом для мишени) относится к белку, например, к цепи иммуноглобулина или ее фрагменту, содержащему по меньшей мере одну последовательность вариабельного домена иммуноглобулина. Термин "связывающий домен" или "молекула антитела" охватывает антитела и фрагменты антител. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела представляет собой молекулу полиспецифического антитела, например, она содержит множество последовательностей вариабельных доменов иммуноглобулина, причем первая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина из множества характеризуется специфичностью связывания с первым эпитопом, а вторая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина из множества характеризуется специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления молекула полиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело характеризуется специфичностью в отношении не более чем двух антигенов. Молекула биспецифического антитела характеризуется наличием первой последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания с первым эпитопом, и второй последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания со вторым эпитопом.

Термины "биспецифическое антитело" и "биспецифические антитела" относятся к молекулам, в которых объединены антигенсвязывающие участки двух антител в пределах одной молекулы. Таким образом, биспецифическое антитело способно связывать два разных антигена одновременно или последовательно. Способы получения биспецифических антител хорошо известны из уровня техники. Различные форматы объединения двух антител являются также известными в данной области техники. Формы биспецифических антител по настоящему изобретению включают без ограничения диатело, одноцепочечное диатело, продукт димеризации Fab (Fab-Fab), Fab-scFv и тандемное антитело, как известно специалистам в данной области.

Термин "тяжелая цепь антитела" относится к большей из полипептидных цепей двух типов, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях, которая обычно определяет класс, к которому принадлежит антитело.

Термин "легкая цепь антитела" относится к меньшей из полипептидных цепей двух типов, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Легкие каппа- (к-) и лямбда- (λ-) цепи относятся к двум основным изотипам легких цепей антител.

Термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, образованному с помощью технологии рекомбинантных ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое в бактериофаговой или дрожжевой системе экспрессии. Термин также следует истолковывать как означающий антитело, которое было образовано в результате синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, при этом данная молекула ДНК

экспрессирует белковое антитело или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где последовательность ДНК или аминокислотная последовательность были получены с помощью технологии рекомбинантных ДНК или аминокислотных последовательностей, доступной и хорошо известной из уровня техники.

Термин "антиген" или "Ag" относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может предусматривать продуцирование антител либо активацию специфических иммунокомпетентных клеток или как то, так и другое. Специалисту в данной области будет понятно, что любая макромолекула, в том числе практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, тем самым кодирует "антиген", как этот термин используется в данном документе. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген не должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает без ограничения применение частичных нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности составлены в различных комбинациях для того, чтобы кодировать полипептиды, которые вызывают требуемый иммунный ответ. Более того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген вообще не обязательно должен кодироваться "геном". Очевидно, что антиген может быть образован в результате синтеза, или может быть получен из биологического образца, или может представлять собой макромолекулу, отличную от полипептида. Такой биологический образец может включать без ограничения образец ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

Термин "полиспецифическая связывающая молекула" относится к молекуле, которая специфично связывается с по меньшей мере двумя антигенами и содержит два или более антигенсвязывающих домена. Каждый из антигенсвязывающих доменов может независимо представлять собой фрагмент антитела (например, scFv, Fab, нанотело), лиганд или связывающее средство, полученное не из антитела (например, фибронектин, финомер, дарпин).

Термин "одновалентный", используемый в данном документе применительно к полиспецифической связывающей молекуле, антителу (например, биспецифическому антителу) или фрагменту антитела, относится к полиспецифической связывающей молекуле, антителу (например, биспецифическому антителу) или фрагменту антитела, в которых имеется единственный антигенсвязывающий домен для каждого антигена, с которым связываются полиспецифическая связывающая молекула, антитело (например, биспецифическое антитело) или фрагмент антитела.

Термин "двухвалентный", используемый в данном документе применительно к полиспецифической связывающей молекуле, антителу (например, биспецифическому

антителу) или фрагменту антитела, относится к полиспецифической связывающей молекуле, антителу (например, биспецифическому антителу) или фрагменту антитела, в которых имеются два антигенсвязывающих домена для каждого антигена, с которым связываются полиспецифическая связывающая молекула, антитело (например, биспецифическое антитело) или фрагмент антитела.

Термин "мультимер" относится к агрегату из множества молекул (таких как, без ограничения, антитела (например, биспецифические антитела)), необязательно конъюгированных друг с другом.

Термин "конъюгированный с" относится к одной или нескольким молекулам, ковалентно или нековалентно связанным друг с другом, необязательно непосредственно или с помощью линкера.

Термин "с сайленсингом Fc" относится к Fc-домену, который был модифицирован таким образом, чтобы он характеризовался минимальным взаимодействием с эффекторными клетками. Сайленсинг эффекторных функций может быть достигнут посредством мутаций в Fc-области антител, которые были описаны в уровне техники, таких как, без ограничения, LALA и N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); а также D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181. 6664-69), см. также Heusser et al., WO2012065950. Примеры мутаций, обеспечивающих сайленсинг Fc, охватывают мутантный вариант LALA, содержащий мутации L234A и L235A в аминокислотной последовательности Fc IgG1, DAPA (D265A, P329A) (см., например, US 6737056), N297A, DANAPA (D265A, N297A и P329A) и/или LALADANAPS (L234A, L235A, D265A, N297A и P331S).

Термин "комплекс CD3/TCR" относится к комплексу на поверхности Т-клеток, содержащему TCR, который содержит альфа-цепь TCR и бета-цепь TCR; CD3, который содержит одну гамма-цепь CD3, одну дельта-цепь CD3, а также две эпсилон-цепи CD3 и дзета-домен. Под номерами доступа в UniProt P01848 (TCR-альфа, константный домен), P01850 (TCR-бета, константный домен 1), A0A5B9 (TCR-бета, константный домен 2), P09693 (CD3-гамма), P04234 (CD3-дельта), P07766 (CD3-эпсилон) представлены иллюстративные человеческие последовательности этих цепей, за исключением дзета-цепи, отвечающей за внутриклеточную передачу сигнала, которая обсуждается более подробно ниже. Дополнительные соответствующие номера доступа включают A0A075B662 (TCR-альфа мыши, константный домен), A0A0A6YWV4 и/или A0A075B5J3 (TCR-бета мыши, константный домен 1), A0A075B5J4 (TCR-бета мыши, константный домен 2), P11942 (CD3-гамма мыши), P04235 (CD3-дельта мыши), P22646 (CD3-эпсилон мыши).

Термин "CD28" относится к гликопротеину CD28, специфичному для Т-клеток, также называемому Tp44, а также всем его альтернативным названиям, который функционирует в качестве костимулирующей молекулы. Под номером доступа в UniProt P10747 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD28 человека (см. также HGNC: 1653, Entrez Gene: 940, Ensembl: ENSG00000178562 и OMIM:

186760). Дополнительные соответствующие последовательности CD28 включают номер доступа в UniProt P21041 (CD28 мыши).

Термин "ICOS" относится к индуцируемому костимулятору Т-клеток, также называемому AILIM, CVID1, CD278, а также всем его альтернативным названиям, который функционирует в качестве костимулирующей молекулы. Под номером доступа в UniProt Q9Y6W8 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности ICOS человека (см. также HGNC: 5351, Entrez Gene: 29851, Ensembl: ENSG00000163600 и OMIM: 604558). Дополнительные соответствующие последовательности ICOS включают номер доступа в UniProt Q9WVS0 (ICOS мыши).

Термин "CD27" относится к активационному антигену CD27 Т-клеток, представителю 7 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, T14, активационному антигену S152 Т-клеток, Tp55, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве костимулирующей молекулы. Под номером доступа в UniProt P26842 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD27 человека (см. также HGNC: 11922, Entrez Gene: 939, Ensembl: ENSG00000139193 и OMIM: 186711). Дополнительные соответствующие последовательности CD27 включают номер доступа в UniProt P41272 (CD27 мыши).

Термин "CD25" относится к альфа-субъединице рецептора IL-2, TAC-антигену, p55, антигену 10 инсулинозависимого сахарного диабета, IMD21, P55, TCGFR, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве рецептора фактора роста. Под номером доступа в UniProt P01589 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD25 человека (см. также HGNC: 6008, Entrez Gene: 3559, Ensembl: ENSG00000134460 и OMIM: 147730). Дополнительные соответствующие последовательности CD25 включают номер доступа в UniProt P01590 (CD25 мыши).

Термин "4-1BB" относится к CD137 или представителю 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве костимулирующей молекулы. Под номером доступа в UniProt Q07011 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности 4-1BB человека (см. также HGNC: 11924, Entrez Gene: 3604, Ensembl: ENSG00000049249 и OMIM: 602250). Дополнительные соответствующие последовательности 4-1BB включают номер доступа в UniProt P20334 (4-1BB мыши).

Термин "IL6RA" относится к альфа-субъединице рецептора IL-6 или CD126, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве рецептора фактора роста. Под номером доступа в UniProt P08887 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности IL6RA человека (см. также HGNC: 6019, Entrez Gene: 3570, Ensembl: ENSG00000160712 и OMIM: 147880. Дополнительные соответствующие последовательности IL6RA включают номер доступа в UniProt P22272 (IL6RA мыши).

Термин "IL6RB" относится к бета-субъединице рецептора IL-6 или CD130, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве рецептора фактора

роста. Под номером доступа в UniProt P40189 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности IL6RB человека. Дополнительные соответствующие последовательности IL6RB включают номер доступа в UniProt Q00560 (IL6RB мыши).

Термин "CD2" относится к Т-клеточному поверхностному антигену T11/Leu-5/CD2, лимфоцитарному функциональному антигену 2, T11 или рецептору эритроцитов/розеток/LFA-3, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве рецептора фактора роста. Под номером доступа в UniProt P06729 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD2 человека (см. также HGNC: 1639, Entrez Gene: 914, Ensembl: ENSG00000116824 и OMIM: 186990). Дополнительные соответствующие последовательности CD2 включают номер доступа в UniProt P08920 (CD2 мыши).

Термины "противоопухолевый эффект" и "противораковый эффект" используются взаимозаменяемо и относятся к биологическому эффекту, который может проявляться различным образом, в том числе без ограничения, например, в виде уменьшения объема опухоли или объема ракового образования, уменьшения количества опухолевых клеток или раковых клеток, уменьшения количества метастазов, увеличения ожидаемой продолжительности жизни, уменьшения уровня пролиферации опухолевых клеток или пролиферации раковых клеток, уменьшения выживаемости опухолевых клеток или выживаемости раковых клеток или ослабления различных физиологических симптомов, ассоциированных с раковым состоянием. "Противоопухолевый эффект" или "противораковый эффект" также может проявляться в виде способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по настоящему изобретению в первую очередь предупреждать появление опухоли или рака.

Термин "аутологичный" относится к любому материалу, полученному от того же индивидуума, которому он позднее должен быть повторно введен.

Термин "аллогенный" относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивидуум, которому данный материал вводят. Говорят, что два или более индивидуума являются аллогенными по отношению друг к другу, если их гены в одном или нескольких локусах не являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления аллогенный материал от индивидуумов одного и того же вида может характеризоваться степенью генетической разнородности, достаточной для их антигенного взаимодействия.

Термин "ксеногенный" относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

Термин "аферез", используемый в данном документе, относится к признанному в данной области экстракорпоральному способу, при котором кровь донора или пациента отбирают у донора или пациента и пропускают через аппарат, который отделяет выбранные определенные составляющие компоненты, а остальную часть возвращает в кровоток донору или пациенту, например, посредством ретрансфузии. Таким образом, применительно к "образцу, полученному путем афереза" подразумевают образец,

полученный с использованием афереза.

Термин "рак" относится к заболеванию, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части организма. Примеры различных видов рака описаны в данном документе и включают без ограничения рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого и т. п. В некоторых вариантах осуществления формы рака, лечение которых осуществляют посредством способов, описанных в данном документе, включают множественную миелому, лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому.

Термины "опухоль" и "рак" используются в данном документе взаимозаменяемо, например, оба термина охватывают солидные опухоли и опухоли жидких тканей, например, диффузные или циркулирующие. Используемый в данном документе термин "рак" или "опухоль" включает предзлокачественные, а также злокачественные формы рака и опухоли.

Используемый в данном документе термин "полученный из" указывает на взаимосвязь между первой и второй молекулами. Это обычно относится к структурному сходству между первой молекулой и второй молекулой и не имеет дополнительного значения или не включает ограничение способа или источника в отношении первой молекулы, которая получена из второй молекулы. Например, в случае с внутриклеточным сигнальным доменом, который получен из молекулы CD3-дзета, внутриклеточный сигнальный домен сохраняет структуру CD3-дзета в достаточной мере для того, чтобы обладать необходимой функцией, а именно способностью образовывать сигнал в подходящих условиях. Это не имеет дополнительного значения или не включает ограничение в отношении конкретного способа получения внутриклеточного сигнального домена, например, это не означает, что для обеспечения наличия внутриклеточного сигнального домена нужно начинать с последовательности CD3-дзета и удалять нежелательную последовательность или вводить мутации для получения внутриклеточного сигнального домена.

Термин "консервативные модификации последовательности" относится к аминокислотным модификациям, которые не оказывают значительного влияния на характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего аминокислотную последовательность, или не изменяют их в значительной степени. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены в антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных методик, известных из уровня техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства

аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в CAR по настоящему изобретению могут быть заменены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененный CAR можно протестировать с использованием функциональных анализов, описанных в данном документе.

Термин "стимуляция" применительно к стимуляции стимулирующей и/или костимулирующей молекулой относится к ответу, например, первичному или вторичному ответу, индуцированному путем связывания стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) и/или костимулирующей молекулы (например, CD28 или 4-1BB) с ее когнатным лигандом, которое опосредует событие передачи сигнала, такое как, без ограничения, передача сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать изменение экспрессии определенных молекул и/или реорганизацию структур цитоскелета и т. п.

Термин "стимулирующая молекула" относится к молекуле, экспрессируемой Т-клеткой, которая обеспечивает первичную(первичные) цитоплазматическую(цитоплазматические) сигнальную(сигнальные) последовательность(последовательности), регулирующую(регулирующие) первичную активацию комплекса TCR стимулирующим образом в по меньшей мере некоторых аспектах сигнального пути Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления ITAM-содержащий домен в CAR воспроизводит передачу сигнала от первичного TCR независимо от эндогенных комплексов TCR. В некоторых вариантах осуществления первичный сигнал инициируется, например, путем связывания комплекса TCR/CD3 с молекулой MHC, нагруженной пептидом, и это приводит к опосредованию ответа Т-клеток, в том числе без ограничения пролиферации, активации, дифференцировки и т. п. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также называемая "первичным сигнальным доменом"), которая действует стимулирующим образом, может содержать сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры ITAM-содержащей первичной цитоплазматической сигнальной последовательности, которая является особенно применимой в настоящем изобретении, включают без ограничения последовательности, полученные из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как "ICOS"), FcεRI и CD66d, DAP10

и DAP12. В конкретном CAR по настоящему изобретению внутриклеточный сигнальный домен в любом одном или нескольких CAR по настоящему изобретению содержит внутриклеточную сигнальную последовательность, например, первичную сигнальную последовательность CD3-дзета. Термин "антигенпрезентирующая клетка" или "APC" относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (например, B-клетка, дендритная клетка и т. п.), которая представляет чужеродный антиген в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC) на своей поверхности. T-клетки могут распознавать эти комплексы с помощью своих T-клеточных рецепторов (TCR). APC процессируют антигены и презентируют их T-клеткам.

Используемый в данном документе термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к внутриклеточной части молекулы. В ряде вариантов осуществления внутриклеточный сигнальный домен передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях отсутствует необходимость использовать всю цепь. В том случае, если используют усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо интактной цепи, при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, подразумевается, что термин "внутриклеточный сигнальный домен" включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

Внутриклеточный сигнальный домен образует сигнал, который способствует осуществлению иммунной эффекторной функции клеткой, содержащей CAR, например, CAR-T-клеткой. Примеры иммунной эффекторной функции, например, у CAR-T-клетки, включают цитолитическую активность и хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Иллюстративные первичные внутриклеточные сигнальные домены включают домены, полученные из молекул, отвечающих за первичную стимуляцию или антигензависимую стимуляцию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. Иллюстративные костимулирующие внутриклеточные сигнальные домены включают домены, полученные из молекул, отвечающих за костимулирующие сигналы или антигеннезависимую стимуляцию. Например, в случае с CART первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность T-клеточного рецептора, и костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность корецептора или костимулирующей молекулы.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры ITAM-содержащих первичных цитоплазматических сигнальных

последовательностей включают без ограничения последовательности, полученные из CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как "ICOS"), FcεRI, CD66d, DAP10 и DAP12.

Термин "дзета" или, в качестве альтернативы, "дзета-цепь", "CD3-дзета" или "TCR-дзета" относится к CD247. Под номером доступа Swiss-Prot P20963 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD3-дзета человека. "Стимулирующий домен дзета" или, в качестве альтернативы, "стимулирующий домен CD3-дзета" или "стимулирующий домен TCR-дзета" относится к стимулирующему домену CD3-дзета или его варианту (например, молекуле, имеющей мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки или делеции). В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен дзета содержит остатки 52-164 из последовательности под номером доступа в GenBank BAG36664.1 или ее варианта (например, молекулы, имеющей мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки или делеции). В некоторых вариантах осуществления "стимулирующий домен дзета" или "стимулирующий домен CD3-дзета" представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9 или 10, или ее вариант (например, молекулу, имеющую мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки или делеции).

Термин "костимулирующая молекула" относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфично связывается с костимулирующим лигандом, за счет чего происходит опосредование костимулируемого ответа Т-клетки, такого как, без ограничения, пролиферация. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают без ограничения молекулу MHC I класса, белковые рецепторы TNF, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, лиганд Toll-подобного рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD28-OX40, CD28-4-1BB и лиганд, который специфично связывается с CD83.

Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен относится к внутриклеточной части костимулирующей молекулы.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он получен, или их функциональный фрагмент.

"Костимулирующий домен 4-1BB" относится к костимулирующему домену 4-1BB или его варианту (например, молекуле, имеющей мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки или делеции). В некоторых вариантах осуществления "костимулирующий домен 4-1BB" представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, или ее вариант (например, молекулу, имеющую мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки или делеции).

Используемый в данном документе термин "иммунная эффекторная клетка" относится к клетке, которая вовлечена в иммунный ответ, например, способствуя осуществлению иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают Т-клетки, например, альфа/бета-Т-клетки и гамма/дельта-Т-клетки, В-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), естественные Т-клетки-киллеры (NKT), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения.

Используемый в данном документе термин "иммунная эффекторная функция или иммунный эффекторный ответ" относится к функции или ответу, например, иммунной эффекторной клетки, которые усиливают иммунную атаку на клетку-мишень или способствуют ей. Например, иммунная эффекторная функция или ответ относятся к свойству Т- или NK-клетки, которое способствует уничтожению или ингибированию роста или пролиферации клетки-мишени. В случае с Т-клеткой первичная стимуляция и костимуляция являются примерами иммунных эффекторных функции или ответа.

Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Например, эффекторная функция Т-клетки может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов.

Термин "кодирование" относится к внутренне присущему свойству специфических последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза в ходе биологических процессов других полимеров и макромолекул, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (т. е. рРНК, тРНК и мРНК) либо определенную последовательность аминокислот и биологические свойства, обусловленные ими. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодирует белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, в клетке или другой биологической системе продуцируется белок. Как кодирующая нить, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно представлена в перечнях последовательностей, так и некодирующая нить, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут обозначаться как кодирующие белок или другой продукт данного гена или кДНК.

Если не указано иное, то "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют одну и ту

же аминокислотную последовательность. Фраза "нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК" может также включать интроны в той степени, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в каком-либо варианте содержать интрон(интроны).

Термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, описанных в данном документе, эффективному для достижения конкретного биологического результата.

Термин "эндогенный" относится к любому материалу, полученному из организма, клетки, ткани или системы или продуцируемому внутри них.

Термин "экзогенный" относится к любому материалу, введенному в организм, клетку, ткань или систему или продуцируемому вне их.

Термин "экспрессия" относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления экспрессия включает трансляцию мРНК, введенной в клетку.

Термин "вектор для переноса" относится к композиции, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно применять для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Из уровня техники известны многочисленные векторы, в том числе без ограничения линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, ассоциированные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор для переноса" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Данный термин также следует толковать таким образом, что он дополнительно включает неплазмидные и невирусные соединения, которые содействуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновое соединение, липосома и т. п. Примеры вирусных векторов для переноса включают без ограничения аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

Термин "экспрессионный вектор" относится к вектору, который содержит рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности, контролирующие экспрессию, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, которая должна экспрессироваться. Экспрессионный вектор содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; а другие элементы для экспрессии могут предоставляться клеткой-хозяином или в системе для экспрессии in vitro. Экспрессионные векторы включают все векторы, известные из уровня техники, в том числе космиды, плазмиды (например, "голые" или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), в состав которых включен рекомбинантный полинуклеотид.

Термин "лентивирус" относится к роду из семейства Retroviridae. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической

информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому они в качестве векторов являются одним из наиболее эффективных способов доставки генов. Все из HIV, SIV и FIV являются примерами лентивирусов.

Термин "лентивирусный вектор" относится к вектору, полученному из по меньшей мере части генома лентивируса, в том числе, в частности, к самоинактивирующемуся лентивирусному вектору, представленному в Milone et al., Mol. Ther. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинической практике, включают без ограничения, например, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также являются доступными и известны специалисту в данной области.

Термин "гомологичный" или "идентичность" относится к идентичности последовательностей субъединиц у двух полимерных молекул, например, двух молекул нуклеиновой кислоты, таких как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или двух молекул полипептидов. Если положение субъединицы в обеих из двух молекул занимает одна и та же мономерная субъединица, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то они являются гомологичными или идентичными по этому положению. Гомология между двумя последовательностями находится в прямой зависимости от количества совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях является гомологичной, то эти две последовательности являются гомологичными на 50%; если 90% положений (например, 9 из 10) являются совпадающими или гомологичными, то две последовательности являются гомологичными на 90%.

"Гуманизированные" формы антител, отличных от человеческих (например, мышиных), представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')2 или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, отличного от человеческого. В большинстве случаев гуманизированные антитела и фрагменты данных антител представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело или фрагмент антитела), в которых остатки из определяющей комплементарность области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR вида, отличного от человека (донорного антитела), такого как мышь, крыса или кролик, обладающими требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками, отличными от человеческих. Кроме того, гуманизированное антитело/фрагмент антитела может содержать остатки, не обнаруживаемые ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасных областей. С помощью этих модификаций можно дополнительно улучшить и оптимизировать функциональные характеристики антитела

или фрагмента антитела. Как правило, гуманизированное антитело или фрагмент этого антитела будет содержать по существу все из по меньшей мере одного и, как правило, двух, вариабельных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют областям иммуноглобулина, отличного от человеческого, и все FR-области или их значительная часть представляют собой области с последовательностью иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или фрагмент антитела также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Дополнительные подробности см. в Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

"Полностью человеческий" относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, где целая молекула имеет человеческое происхождение или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной человеческой форме антитела или иммуноглобулина.

Термин "выделенный" означает измененный относительно природного состояния или извлеченный из него. Например, нуклеиновая кислота или пептид, в природных условиях присутствующие в живом животном, не являются "выделенными", однако те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от материалов, сопутствующих им в их природном состоянии, являются "выделенными". Выделенные нуклеиновая кислота или белок могут находиться в по существу очищенной форме или могут находиться в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

В контексте настоящего изобретения используются следующие сокращения для общераспространенных оснований нуклеиновых кислот. "A" относится к аденозину, "C" относится к цитозину, "G" относится к гуанозину, "T" относится к тимидину, и "U" относится к уридину.

Термин "функционально связанный" или "транскрипционный контроль" относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, приводящей к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты в тех случаях, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты размещена в функциональной взаимосвязи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две области, кодирующие белок, находятся в одной и той же рамке считывания.

Термин "парентеральное" введение иммуногенной композиции включает, например, методики подкожной (s.c.), внутривенной (i.v.), внутримышечной (i.m.) или внутригрудинной инъекции, внутриопухолевого введения или инфузии.

Термин "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "полинуклеотид" или "молекула полинуклеотида" относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одно- или двухнитевой форме. Если специально не ограничено, то данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, сходными со свойствами эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются посредством механизма, сходного с механизмом для встречающихся в природе нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "полинуклеотид" или "молекула полинуклеотида" предусматривает производное или аналог нуклеотида/нуклеозида. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также в неявной форме охватывает ее варианты с консервативными модификациями (например, с заменами вырожденными кодонами, например, консервативными заменами), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную в явной форме. В частности, замены вырожденными кодонами, например, консервативные замены, можно осуществлять посредством образования последовательностей, в которых в третьем положении одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов произведена замена любым из канонических оснований и/или остатками дезоксиинозина (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не установлено ограничение на максимальное количество аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислоты, соединенные друг с другом пептидными связями. Используемый в данном документе термин относится как к коротким цепям, которые также обычно называются в данной области техники, например, пептидами, олигопептидами и олигомерами, так и к более длинным цепям, которые обычно называются в данной области техники белками, которых существует множество типов. "Полипептиды" включают, например, среди прочих, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки. Полипептид включает природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

Термин "промотор" относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки или введенным синтетическим аппаратом, которая необходима для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Термин "промоторная/регуляторная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая необходима для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может являться коровой промоторной последовательностью, а в других случаях эта последовательность может также содержать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии продукта гена. Например, промоторная/регуляторная последовательность может представлять собой последовательность, которая обеспечивает экспрессию продукта гена тканеспецифическим образом.

Термин "конститутивный промотор" относится к нуклеотидной последовательности, которая, находясь в функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, обуславливает продуцирование продукта гена в клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

Термин "индуцируемый промотор" относится к нуклеотидной последовательности, которая, находясь в функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, обуславливает продуцирование продукта гена в клетке по существу только в случае присутствия в клетке индуктора, который соответствует данному промотору.

Термин "тканеспецифический промотор" относится к нуклеотидной последовательности, которая, находясь в функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет ген, обуславливает продуцирование продукта гена в клетке по существу только в том случае, если клетка является клеткой из того типа ткани, который соответствует данному промотору.

Термины "антиген, ассоциированный с раком", "опухолевый антиген", "антиген, связанный с гиперпролиферативным нарушением" и "антиген, ассоциированный с гиперпролиферативным нарушением" взаимозаменяемо относятся к антигенам, которые являются общими для специфических гиперпролиферативных нарушений. В некоторых вариантах осуществления такие термины относятся к молекуле (как правило, белку, углеводу или липиду), которая экспрессируется на поверхности раковой клетки полностью либо в виде фрагмента (например, молекула MHC/пептид) и которая применима для предпочтительного нацеливания фармакологического средства на раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой маркер, экспрессируемый как нормальными клетками, так и раковыми клетками, например, маркер линии дифференцировки, например, CD19 на B-клетках. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая в раковой клетке сверхэкспрессируется по сравнению с нормальной клеткой, например, характеризуется 1-кратной сверхэкспрессией, 2-кратной сверхэкспрессией, 3-кратной или большей сверхэкспрессией по сравнению с нормальной клеткой. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая синтезируется в раковой клетке ненадлежащим

образом, например, молекулу, которая содержит делеции, добавления или мутации по сравнению с молекулой, экспрессируемой на нормальной клетке. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген будет экспрессироваться исключительно на клеточной поверхности раковой клетки, полностью или в виде фрагмента (например, молекула MHC/пептид), и не будет синтезироваться или экспрессироваться на поверхности нормальной клетки. В некоторых вариантах осуществления антигены, связанные с гиперпролиферативным нарушением, по настоящему изобретению получены из раковых образований, включающих без ограничения первичную или метастатическую меланому, тимому, лимфому, саркому, рак легкого, рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, формы лейкоза, рак матки, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки и формы аденокарциномы, такие как рак молочной железы, рак предстательной железы (например, кастрационнорезистентный или резистентный к терапии рак предстательной железы или метастатический рак предстательной железы), рак яичника, рак поджелудочной железы и т. п., или нарушение пролиферации плазматических клеток, например, бессимптомную миелому ("тлеющую" множественную миелому или вялотекущую миелому), моноклональную гаммапатию неустановленной этиологии (MGUS), макроглобулинемию Вальденстрема, формы плазмоцитомы (например, плазмоклеточную дискразию, солитарную миелому, солитарную плазмоцитому, экстрамедуллярную плазмоцитому и множественную плазмоцитому), системный амилоидоз в форме амилоидоза легких цепей и POEMS-синдром (также известный как синдром Кроу-Фукаса, болезнь Такатсуки и PEP-синдром). В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению включают CAR, содержащие антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который связывается с пептидом, презентируемым молекулой MHC. Обычно пептиды, происходящие из эндогенных белков, заполняют карманы молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC) I класса и распознаются Т-клеточными рецепторами (TCR) на CD8+ Т-лимфоцитах. Комплексы молекул MHC I класса конститутивно экспрессируются всеми ядросодержащими клетками. При раке комплексы вирусоспецифический и/или опухолеспецифический пептид/молекула MHC представляют собой уникальный класс мишеней клеточной поверхности для иммунотерапии. Были описаны TCR-подобные антитела, нацеливающиеся на пептиды, происходящие из вирусных или опухолевых антигенов, представленные в контексте лейкоцитарного антигена человека (HLA)-A1 или HLA-A2 (см., например, Sastry et al., J Virol. 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther 2001 8(21) :1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176):176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100). Например, TCR-подобное антитело можно идентифицировать при скрининге библиотеки, такой как фаг-дисплейная библиотека scFv человека.

Термины "антиген, обеспечивающий поддержание опухоли" или "антиген, обеспечивающий поддержание рака" взаимозаменяемо относятся к молекуле (как

правило, белку, углеводу или липиду), которая экспрессируется на поверхности клетки, которая сама по себе не является раковой, но обеспечивает поддержание раковых клеток, например, путем способствования их росту или выживанию, например, устойчивости к иммунным клеткам. Иллюстративные клетки данного типа включают стромальные клетки и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC). Антиген, обеспечивающий поддержание опухоли, сам по себе не обязательно играет роль в поддержании опухолевых клеток, при условии, что антиген присутствует в клетке, которая обеспечивает поддержание раковых клеток.

Термин "гибкий полипептидный линкер" или "линкер", используемый применительно к scFv, относится к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как глициновые и/или сериновые остатки, используемые в отдельности или в комбинации, для связывания вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи друг с другом. В некоторых вариантах осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)n, где n представляет собой положительное целое число, которое равняется или больше 1 (SEQ ID NO: 41). Например, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 и n=6, n=7, n=8, n=9 и n=10. В некоторых вариантах осуществления гибкие полипептидные линкеры включают без ограничения (Gly4Ser)4 (SEQ ID NO: 27) или (Gly4 Ser)3 (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах осуществления линкеры содержат множественные повторы (Gly2Ser) (GlySer) или (Gly3Ser) (SEQ ID NO: 29). Также в объем настоящего изобретения включены линкеры, описанные в WO2012/138475, включенной в данный документ посредством ссылки.

Как используется в данном документе, 5'-кэп (также называемый РНК-кэпом, 7-метилгуанозиновым РНК-кэпом или РНК-кэпом m7G) представляет собой модифицированный гуаниновый нуклеотид, который добавляется к "переднему", или 5'-концу, эукариотической матричной РНК вскоре после начала транскрипции. 5'-кэп состоит из концевой группы, которая связана с первым транскрибированным нуклеотидом. Его присутствие является критически важным для распознавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэпа сопряжено с транскрипцией и происходит совместно с транскрипцией, так что каждое из этих событий влияет на другое. Вскоре после начала транскрипции 5'-конец синтезируемой мРНК связывается с кэп-синтезирующим комплексом, ассоциированным с РНК-полимеразой. Этот ферментативный комплекс катализирует химические реакции, которые необходимы для кэпирования мРНК. Синтез протекает в виде многоступенчатой биохимической реакции. Кэпирующий фрагмент можно модифицировать для модулирования функциональных свойств мРНК, таких как ее стабильность или эффективность трансляции.

Как используется в данном документе, "РНК, транскрибированная in vitro" относится к РНК, предпочтительно мРНК, которая была синтезирована in vitro. В некоторых вариантах осуществления РНК представляет собой мРНК. Обычно РНК, транскрибированная in vitro, образуется из вектора транскрипции in vitro. Вектор

транскрипции in vitro содержит матрицу, используемую для образования РНК, транскрибированной in vitro.

Как используется в данном документе, "поли(А)" представляет собой последовательный ряд аденозиновых остатков, присоединенных путем полиаденилирования к мРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкции для транзиентной экспрессии длина поли(А) составляет от 50 до 5000 (SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления длина поли(А) составляет более 64. В некоторых вариантах осуществления длина поли(А) составляет более 100. В некоторых вариантах осуществления длина поли(А) составляет более 300. В некоторых вариантах осуществления длина поли(А) составляет более 400. Последовательности поли(А) можно модифицировать с помощью химических средств или ферментов для модулирования функциональных свойств мРНК, таких как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

Как используется в данном документе, "полиаденилирование" относится к ковалентной связи полиаденилилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариотических организмов большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-концевой поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (часто несколько сотен), добавленных к пре-мРНК под действием фермента полиаденилатполимеразы. У высших эукариот поли(А)-хвост добавляется к транскриптам, которые содержат определенную последовательность - сигнал полиаденилирования. Поли(А)-хвост и связанный с ним белок содействуют защите мРНК от разрушения экзонуклеазами. Полиаденилирование также важно для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре сразу после транскрипции ДНК в РНК, но дополнительно может также происходить позднее в цитоплазме. После завершения транскрипции цепь мРНК расщепляется под действием эндонуклеазного комплекса, ассоциированного с РНК-полимеразой. Сайт расщепления обычно характеризуется наличием последовательности оснований AAUAAA вблизи сайта расщепления. После того, как мРНК была расщеплена, к свободному 3'-концу в сайте расщепления добавляются аденозиновые остатки.

Как используется в данном документе, "транзиентный" относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение периода нескольких часов, дней или недель, где период времени экспрессии является меньшим, чем период времени для экспрессии гена в случае, если он интегрирован в геном или содержится в стабильном плазмидном репликоне в клетке-хозяине.

Используемые в данном документе термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к снижению или ослаблению прогрессирования, тяжести и/или продолжительности пролиферативного нарушения или ослаблению одного или нескольких симптомов (предпочтительно одного или нескольких различимых симптомов) пролиферативного нарушения в результате введения одного или нескольких средств

терапии (например, одного или нескольких терапевтических средств, таких как CAR по настоящему изобретению). В конкретных вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к ослаблению по меньшей мере одного измеряемого физического параметра пролиферативного нарушения, такого как рост опухоли, не обязательно различимого для пациента. В других вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к ингибированию прогрессирования пролиферативного нарушения либо на физическом уровне, например, посредством стабилизации различимого симптома, либо на физиологическом уровне, например, посредством стабилизации физического параметра, либо как на одном, так и на другом уровнях. В других вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к снижению или стабилизации размера опухоли или количества раковых клеток.

Термин "путь передачи сигнала" относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами-переносчиками сигналов, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза "рецептор клеточной поверхности" включает молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать сигнал через мембрану клетки.

Термин "субъект" предполагает включение живых организмов, у которых можно вызвать иммунный ответ (например, млекопитающих, человека).

Термин "по существу очищенная клетка" относится к клетке, которая по сути свободна от других типов клеток. "По существу очищенная клетка" также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно ассоциирована в своем встречающемся в природе состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к однородной популяции клеток. В других случаях данный термин просто относится к клетке, которая была отделена от клеток, с которыми она в природных условиях ассоциирована в своем природном состоянии. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют in vitro. В некоторых вариантах осуществления клетки не культивируют in vitro.

Используемый в данном документе термин "терапевтический" означает лечение. Терапевтический эффект получают путем ослабления, подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

Используемый в данном документе термин "профилактика" означает предупреждение или профилактическое лечение заболевания или болезненного состояния.

Термины "трансфицированный", или "трансформированный", или "трансдуцированный" относятся к процессу, в ходе которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. "Трансфицированная", или "трансформированная", или "трансдуцированная" клетка представляет собой клетку, которая была подвергнута трансфекции, трансформации или трансдукции с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты. Такая клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

Термин "специфично связывается" относится к антителу или лиганду, которые распознают своего когнатного белкового партнера по связыванию (например, стимулирующую и/или костимулирующую молекулу, присутствующую на Т-клетке), присутствующего в образце, и связываются с ним, но при этом это антитело или лиганд по существу не распознают или не связывают другие молекулы в образце.

Как используется в данном документе, "регулируемый химерный антигенный рецептор (RCAR)" относится к набору полипептидов, как правило, в простейших вариантах осуществления двух, которые, находясь в иммунной эффекторной клетке, наделяют клетку специфичностью в отношении клетки-мишени, как правило, раковой клетки, и образованием внутриклеточного сигнала. В некоторых вариантах осуществления RCAR содержит по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый в данном документе "внутриклеточным сигнальным доменом"), содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, как определено в данном документе применительно к молекуле CAR. В некоторых вариантах осуществления полипептиды из набора в RCAR не являются смежными друг с другом, например, находятся в разных полипептидных цепях. В некоторых вариантах осуществления RCAR содержит димеризационный переключатель, который при наличии димеризующей молекулы может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых вариантах осуществления RCAR экспрессируется в клетке (например, иммунной эффекторной клетке), описанной в данном документе, например, в клетке, экспрессирующей RCAR (также называемой в данном документе "RCARX-клеткой"). В некоторых вариантах осуществления RCARX-клетка представляет собой Т-клетку и называется RCAR-Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления RCARX-клетка представляет собой NK-клетку и называется RCAR-N-клеткой. RCAR может наделять клетку, экспрессирующую RCAR, специфичностью в отношении клетки-мишени, как правило, раковой клетки, и регулируемым образованием внутриклеточного сигнала или пролиферацией, что может оптимизировать иммуноэффекторное свойство клетки, экспрессирующей RCAR. В ряде вариантов осуществления клетка с RCAR по меньшей мере частично зависит от антигенсвязывающего домена в обеспечении специфичности в отношении клетки-мишени, которая содержит антиген, связываемый антигенсвязывающим доменом.

Используемый в данном документе термин "мембранный якорь" или "домен прикрепления к мембране" относится к полипептиду или фрагменту, например, к миристоильной группе, достаточному для заякоривания внеклеточного или внутриклеточного домена на плазматической мембране.

Используемый в данном документе термин "переключающий домен", например, в отношении RCAR, относится к объекту, обычно полипептидному объекту, который в присутствии димеризующей молекулы ассоциирует с другим переключающим доменом.

Ассоциация приводит к функциональному связыванию первого объекта, связанного, например, слитого, с первым переключающим доменом, и второго объекта, связанного, например, слитого, со вторым переключающим доменом. Первый и второй переключающие домены в совокупности называются димеризационным переключателем. В ряде вариантов осуществления первый и второй переключающие домены являются одинаковыми, например, они являются полипептидами, имеющими одинаковую первичную аминокислотную последовательность, и в совокупности называются гомодимеризационным переключателем. В ряде вариантов осуществления первый и второй переключающие домены отличаются друг от друга, например, они являются полипептидами, имеющими разные первичные аминокислотные последовательности, и в совокупности называются гетеродимеризационным переключателем. В ряде вариантов осуществления переключатель является внутриклеточным. В ряде вариантов осуществления переключатель является внеклеточным. В ряде вариантов осуществления переключающий домен представляет собой полипептидный объект, например, объект на основе FKBP или FRB, а димеризующая молекула представляет собой малую молекулу, например, рапалог. В ряде вариантов осуществления переключающий домен представляет собой полипептидный объект, например, scFv, который связывает пептид myc, а димеризующая молекула представляет собой полипептид, его фрагмент или мультимер полипептида, например, лиганд myc или мультимеры лиганда myc, которые связываются с одним или несколькими scFv для myc. В ряде вариантов осуществления переключающий домен представляет собой полипептидный объект, например, рецептор для myc, а димеризующая молекула представляет собой антитело или его фрагменты, например, антитело к myc.

Используемый в данном документе термин "димеризующая молекула", например, в отношении RCAR, относится к молекуле, которая способствует образованию ассоциации первого переключающего домена со вторым переключающим доменом. В ряде вариантов осуществления димеризующая молекула не встречается у субъекта в природе или не встречается в концентрациях, которые могут привести к значительной степени димеризации. В ряде вариантов осуществления димеризующая молекула представляет собой малую молекулу, например, рапамицин или рапалог, например, RAD001.

Термин "низкая доза, усиливающая иммунный ответ" при использовании в отношении ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора mTOR, например, RAD001 или рапамицина, или каталитического ингибитора mTOR относится к дозе ингибитора mTOR, которая обеспечивает частичное, но не полное, ингибирование активности mTOR, например, согласно измерению по ингибированию активности киназы P70-S6. Способы оценивания активности mTOR, например, по ингибированию киназы P70-S6, обсуждаются в данном документе. Доза является недостаточной, чтобы вызвать полное подавление иммунитета, но достаточной для усиления иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления низкая доза, усиливающая иммунный ответ, ингибитора mTOR приводит к уменьшению количества PD-1-положительных Т-клеток

и/или увеличению количества PD-1-отрицательных Т-клеток или увеличению соотношения PD-1-отрицательные Т-клетки/PD-1-положительные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления низкая доза, усиливающая иммунный ответ, ингибитора mTOR приводит к увеличению количества необученных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления низкая доза, усиливающая иммунный ответ, ингибитора mTOR приводит к одному или нескольким из следующего:

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

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

увеличению количества предшественников Т-клеток памяти, например, клеток с любой из следующих характеристик или их комбинацией: повышенным уровнем $CD62L^{высокий}$, повышенным уровнем $CD127^{высокий}$, повышенным уровнем $CD27^{+}$, сниженным уровнем KLRG1 и повышенным уровнем BCL2;

где любое из изменений, описанных выше, происходит, например, по меньшей мере транзиентно, например, по сравнению с субъектом, не получающим лечение.

Как используется в данном документе, "рефрактерный" относится к заболеванию, например, раку, которое не отвечает на лечение. В ряде вариантов осуществления рефрактерный рак может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения. В других вариантах осуществления рефрактерный рак может стать устойчивым в ходе лечения. Рефрактерный рак также называют устойчивым раком.

Как используется в данном документе, "рецидивирующий" или "рецидив" относится к возвращению или повторному появлению заболевания (например, рака) или признаков и симптомов заболевания, такого как рак, после периода улучшения или восприимчивости, например, после предшествующего лечения с помощью терапии, например, противораковой терапии. Начальный период восприимчивости может предусматривать падение уровня раковых клеток ниже определенного порога, например, ниже 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. Повторное появление может предусматривать возрастание уровня раковых клеток выше определенного порога, например, выше 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. Например, применительно к B-ALL повторное появление может предусматривать, например, повторное появление бластных клеток в крови, костном мозге (> 5%) или любом экстрамедуллярном участке после достижения полного ответа. Полный ответ в данном контексте может предусматривать < 5% бластных клеток в BM. В более широком смысле в некоторых вариантах осуществления ответ (например, полный ответ или частичный ответ) может предусматривать отсутствие выявляемого MRD (минимального остаточного заболевания). В некоторых вариантах осуществления начальный период восприимчивости продолжается в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; по меньшей мере 1, 2, 3 или 4 недель; по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 или 12 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5

лет.

Диапазоны: во всем настоящем раскрытии различные варианты осуществления настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазонов служит лишь для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретно раскрывающее все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание такого диапазона, как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрывающее такие поддиапазоны, как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера, такой диапазон, как 95-99% идентичность, включает что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью и включает такие поддиапазоны, как 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% и 98-99% идентичность. Это применимо независимо от ширины диапазона.

Используемый в данном документе термин "система редактирования генов" относится к системе, например, одной или нескольким молекулам, которые управляют изменением, например, делецией, и осуществляют его в одной или нескольких нуклеиновых кислотах в сайте геномной ДНК, на которую нацеливается указанная система, или рядом с ним. Системы редактирования генов известны из уровня техники и более подробно описаны ниже.

Как используется в данном документе, вводимый "в комбинации" означает, что два (или более) различных средства для лечения доставляют субъекту в период, когда субъект страдает нарушением, например, два или более средства для лечения доставляют после того, как у субъекта было диагностировано нарушение, и до того, как нарушение было излечено или устранено или лечение было прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства для лечения по-прежнему происходит, когда начинается доставка второго, так что в отношении введения имеет место перекрывание. Это иногда упоминается в данном документе как "одновременная" или "параллельная" доставка. В других вариантах осуществления доставка одного средства для лечения заканчивается до начала доставки другого средства для лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство для лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго средства для лечения, или второе средство для лечения снижает интенсивность симптомов в большей степени, чем наблюдалось бы при введении второго средства для лечения в отсутствие первого средства для лечения, или аналогичная ситуация наблюдается с первым средством для лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка является такой, при которой снижение интенсивности симптома или другого параметра, связанного с нарушением, является большим, чем наблюдалось бы при доставке одного средства для лечения в отсутствие другого. Эффект двух средств для

лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или превышающим аддитивный. Доставка может быть такой, что эффект от первого доставленного средства для лечения все еще поддается выявлению при доставке второго.

Термины "истощение" или "истощать", используемые взаимозаменяемо в данном документе, относятся к уменьшению или снижению уровня или количества клетки, белка или макромолекулы в образце после осуществления процесса, например, стадии отбора, например, отрицательного отбора. Истощение может быть полным или частичным истощением по клетке, белку или макромолекуле. В некоторых вариантах осуществления истощение представляет собой по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% уменьшение или снижение уровня или количества клетки, белка или макромолекулы по сравнению с уровнем или количеством клетки, белка или макромолекулы в образце перед осуществлением процесса.

Как используется в данном документе, "необученная Т-клетка" относится к Т-клетке, которая является неопытной в отношении антигена. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, которая является неопытной в отношении антигена, встречалась со своим когнатным антигеном в тимусе, но не на периферии. В некоторых вариантах осуществления необученные Т-клетки являются предшественниками клеток памяти. В некоторых вариантах осуществления необученные Т-клетки экспрессируют как CD45RA, так и CCR7, но не экспрессируют CD45RO. В некоторых вариантах осуществления необученные Т-клетки могут характеризоваться экспрессией CD62L, CD27, CCR7, CD45RA, CD28 и CD127 и отсутствием CD95 или изоформы CD45RO. В некоторых вариантах осуществления необученные Т-клетки экспрессируют CD62L, рецептор IL-7 α, рецептор IL-6 и CD132, но не экспрессируют CD25, CD44, CD69 или CD45RO. В некоторых вариантах осуществления необученные Т-клетки экспрессируют CD45RA, CCR7 и CD62L и не экспрессируют CD95 или рецептор IL-2 β. В некоторых вариантах осуществления уровни поверхностной экспрессии маркеров оценивают с помощью проточной цитометрии.

Термин "центральные Т-клетки памяти" относится к субпопуляции Т-клеток, которые у людей являются CD45RO-положительными и экспрессируют CCR7. В некоторых вариантах осуществления центральные Т-клетки памяти экспрессируют CD95. В некоторых вариантах осуществления центральные Т-клетки памяти экспрессируют IL-2R, IL-7R и/или IL-15R. В некоторых вариантах осуществления центральные Т-клетки памяти экспрессируют CD45RO, CD95, рецептор IL-2 β, CCR7 и CD62L. В некоторых вариантах осуществления уровни поверхностной экспрессии маркеров оценивают с помощью проточной цитометрии.

Термин "стволовые Т-клетки памяти", "Т-клетки памяти, представляющие собой стволовые клетки", "Т-клетки памяти, подобные стволовым клеткам", "стволовые Т-клетки, являющиеся клетками памяти", "стволовые клетки, являющиеся Т-клетками памяти", "клетки памяти, представляющие собой стволовые Т-клетки" или "TSCM-

клетки" относится к субпопуляции Т-клеток памяти со способностью, подобной таковой у стволовых клеток, например, способностью к самообновлению и/или с мультипотентным потенциалом преобразования в субпопуляции Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления стволовые Т-клетки памяти экспрессируют CD45RA, CD95, рецептор IL-2 β, CCR7 и CD62L. В некоторых вариантах осуществления уровни поверхностной экспрессии маркеров оценивают с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные стволовые Т-клетки памяти раскрыты в Gattinoni et al., Nat Med. 2017 January 06; 23(1): 18-27, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Для ясности, если не указано иное, классификация клетки или популяции клеток в качестве "не экспрессирующих", или характеризующихся "отсутствием" определенного маркера, или являющихся "отрицательными в отношении" определенного маркера не обязательно может означать абсолютное отсутствие маркера. Специалист в данной области может без труда сравнить клетку с положительным и/или отрицательным контролем и/или установить предварительно определенное пороговое значение и классифицировать клетку или популяцию клеток в качестве не экспрессирующих или являющихся отрицательными в отношении маркера, если клетка характеризуется уровнем экспрессии ниже предварительно определенного порогового значения или популяция клеток характеризуется общим уровнем экспрессии ниже предварительно определенного порогового значения, с помощью традиционных способов выявления, например, с помощью проточной цитометрии, например, как описано в примерах в данном документе. Например, иллюстративные стратегии гейтирования показаны на фиг. 1G. Например, CCR7-положительные, CD45RO-отрицательные клетки показаны в верхнем левом квадранте на фиг. 1G.

Используемый в данном документе термин "балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM)" для клетки относится к баллу, который отражает степень, в которой клетка демонстрирует фенотип эффекторной Т-клетки памяти (TEM) по сравнению с фенотипом Т-клетки памяти, представляющей собой стволовую клетку (TSCM). Более высокий балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) указывает на увеличение выраженности фенотипа TEM, тогда как более низкий балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) указывает на увеличение выраженности фенотипа TSCM. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) определяют путем измерения экспрессии одного или нескольких генов, которые активируются в TEM-клетках и/или подавляются в TSCM-клетках, например, одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из MXRA7, CLIC1, NAT13, TBC1D2B, GLCCI1, DUSP10, APOBEC3D, CACNB3, ANXA2P2, TPRG1, EOMES, MATK, ARHGAP10, ADAM8, MAN1A1, SLFN12L, SH2D2A, EIF2C4, CD58, MYO1F, RAB27B, ERN1, NPC1, NBEAL2, APOBEC3G, SYTL2, SLC4A4, PIK3AP1, PTGDR, MAF, PLEKHA5, ADRB2, PLXND1, GNAO1, THBS1, PPP2R2B, CYTH3, KLRF1,

FLJ16686, AUTS2, PTPRM, GNLY и GFPT2. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) определяют для каждой клетки с помощью секвенирования РНК, например, секвенирования РНК одиночных клеток (scRNA-seq), что, например, проиллюстрировано в примере 10 в отношении фиг. 39A. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) рассчитывают с использованием среднего логарифмически нормализованного значения экспрессии гена для всех генов в наборе генов.

Используемый в данном документе термин "балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff)" для клетки относится к баллу, который отражает степень, в которой клетка демонстрирует фенотип регуляторной Т-клетки (Treg) по сравнению с фенотипом эффекторной Т-клетки (Teff). Более высокий балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) указывает на увеличение выраженности фенотипа Treg, тогда как более низкий балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) указывает на увеличение выраженности фенотипа Teff. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) определяют путем измерения экспрессии одного или нескольких генов, которые активируются в Treg-клетках и/или подавляются в Teff-клетках, например, одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из C12orf75, SELPLG, SWAP70, RGS1, PRR11, SPATS2L, SPATS2L, TSHR, C14orf145, CASP8, SYT11, ACTN4, ANXA5, GLRX, HLA-DMB, PMCH, RAB11FIP1, IL32, FAM160B1, SHMT2, FRMD4B, CCR3, TNFRSF13B, NTNG2, CLDND1, BARD1, FCER1G, TYMS, ATP1B1, GJB6, FGL2, TK1, SLC2A8, CDKN2A, SKAP2, GPR55, CDCA7, S100A4, GDPD5, PMAIP1, ACOT9, CEP55, SGMS1, ADPRH, AKAP2, HDAC9, IKZF4, CARD17, VAV3, OBFC2A, ITGB1, CIITA, SETD7, HLA-DMA, CCR10, KIAA0101, SLC14A1, PTTG3P, DUSP10, FAM164A, PYHIN1, MYO1F, SLC1A4, MYBL2, PTTG1, RRM2, TP53INP1, CCR5, ST8SIA6, TOX, BFSP2, ITPRIPL1, NCAPH, HLA-DPB2, SYT4, NINJ2, FAM46C, CCR4, GBP5, C15orf53, LMCD1, MKI67, NUSAP1, PDE4A, E2F2, CD58, ARHGEF12, LOC100188949, FAS, HLA-DPB1, SELP, WEE1, HLA-DPA1, FCRL1, ICA1, CNTNAP1, OAS1, METTL7A, CCR6, HLA-DRB4, ANXA2P3, STAM, HLA-DQB2, LGALS1, ANXA2, PI16, DUSP4, LAYN, ANXA2P2, PTPLA, ANXA2P1, ZNF365, LAIR2, LOC541471, RASGRP4, BCAS1, UTS2, MIAT, PRDM1, SEMA3G, FAM129A, HPGD, NCF4, LGALS3, CEACAM4, JAKMIP1, TIGIT, HLA-DRA, IKZF2, HLA-DRB1, FANK1, RTKN2, TRIB1, FCRL3 и FOXP3. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) определяют с помощью секвенирования РНК, например, секвенирования РНК одиночных клеток (scRNA-seq), что, например, проиллюстрировано в примере 10 в отношении фиг. 39B. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) рассчитывают с использованием среднего логарифмически нормализованного значения экспрессии гена для всех генов в наборе генов.

Используемый в данном документе термин "балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости)" для клетки относится к баллу, который отражает степень, в которой клетка демонстрирует фенотип стволовости. Более низкий балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) указывает на увеличение выраженности фенотипа стволовости. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) определяют путем измерения экспрессии одного или нескольких генов, которые активируются в дифференцирующейся стволовой клетке, относительно генов, которые подавляются в гемопоэтической стволовой клетке, например, одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из ACE, BATF, CDK6, CHD2, ERCC2, HOXB4, MEOX1, SFRP1, SP7, SRF, TAL1 и XRCC5. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) определяют с помощью секвенирования РНК, например, секвенирования РНК одиночных клеток (scRNA-seq), как, например, проиллюстрировано в примере 10 в отношении фиг. 39C. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) рассчитывают с использованием среднего логарифмически нормализованного значения экспрессии гена для всех генов в наборе генов.

Используемый в данном документе термин "балл набора генов (активируемые при гипоксии)" для клетки относится к баллу, который отражает степень, в которой клетка демонстрирует фенотип, характерный для гипоксии. Более высокий балл набора генов (активируемые при гипоксии) указывает на увеличение выраженности фенотипа, характерного для гипоксии. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые при гипоксии) определяют путем измерения экспрессии одного или нескольких генов, которые активируются в клетках, подвергающихся гипоксии, например, одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из ABCB1, ACAT1, ADM, ADORA2B, AK2, AK3, ALDH1A1, ALDH1A3, ALDOA, ALDOC, ANGPT2, ANGPTL4, ANXA1, ANXA2, ANXA5, ARHGAP5, ARSE, ART1, BACE2, BATF3, BCL2L1, BCL2L2, BHLHE40, BHLHE41, BIK, BIRC2, BNIP3, BNIP3L, BPI, BTG1, C11orf2, C7orf68, CA12, CA9, CALD1, CCNG2, CCT6A, CD99, CDK1, CDKN1A, CDKN1B, CITED2, CLK1, CNOT7, COL4A5, COL5A1, COL5A2, COL5A3, CP, CTSD, CXCR4, D4S234E, DDIT3, DDIT4, 1-Dec, DKC1, DR1, EDN1, EDN2, EFNA1, EGF, EGR1, EIF4A3, ELF3, ELL2, ENG, ENO1, ENO3, ENPEP, EPO, ERRFI1, ETS1, F3, FABP5, FGF3, FKBP4, FLT1, FN1, FOS, FTL, GAPDH, GBE1, GLRX, GPI, GPRC5A, HAP1, HBP1, HDAC1, HDAC9, HERC3, HERPUD1, HGF, HIF1A, HK1, HK2, HLA-DQB1, HMOX1, HMOX2, HSPA5, HSPD1, HSPH1, HYOU1, ICAM1, ID2, IFI27, IGF2, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP5, IL6, IL8, INSIG1, IRF6, ITGA5, JUN, KDR, KRT14, KRT18, KRT19, LDHA, LDHB, LEP, LGALS1, LONP1, LOX, LRP1, MAP4, MET, MIF, MMP13, MMP2, MMP7, MPI, MT1L, MTL3P, MUC1, MXI1, NDRG1, NFIL3, NFKB1, NFKB2, NOS1, NOS2, NOS2P1, NOS2P2, NOS3, NR3C1, NR4A1, NT5E, ODC1, P4HA1, P4HA2, PAICS, PDGFB, PDK3, PFKFB1, PFKFB3, PFKFB4, PFKL, PGAM1, PGF, PGK1, PGK2, PGM1, PIM1, PIM2, PKM2, PLAU, PLAUR, PLIN2, PLOD2, PNN, PNP, POLM, PPARA, PPAT, PROK1, PSMA3, PSMD9, PTGS1,

PTGS2, QSOX1, RBPJ, RELA, RIOK3, RNASEL, RPL36A, RRP9, SAT1, SERPINB2, SERPINE1, SGSM2, SIAH2, SIN3A, SIRPA, SLC16A1, SLC16A2, SLC20A1, SLC2A1, SLC2A3, SLC3A2, SLC6A10P, SLC6A16, SLC6A6, SLC6A8, SORL1, SPP1, SRSF6, SSSCA1, STC2, STRA13, SYT7, TBPL1, TCEAL1, TEK, TF, TFF3, TFRC, TGFA, TGFB1, TGFB3, TGFBI, TGM2, TH, THBS1, THBS2, TIMM17A, TNFAIP3, TP53, TPBG, TPD52, TPI1, TXN, TXNIP, UMPS, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VIM, VPS11 и XRCC6. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые при гипоксии) определяют с помощью секвенирования РНК, например, секвенирования РНК одиночных клеток (scRNA-seq), как, например, проиллюстрировано в примере 10 в отношении фиг. 39D. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые при гипоксии) рассчитывают с использованием среднего логарифмически нормализованного значения экспрессии гена для всех генов в наборе генов.

Используемый в данном документе термин "балл набора генов (активируемые при аутофагии)" для клетки относится к баллу, который отражает степень, в которой клетка демонстрирует фенотип, характерный для аутофагии. Более высокий балл набора генов (активируемые при аутофагии) указывает на увеличение выраженности фенотипа, характерного для аутофагии. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые при аутофагии) определяют путем измерения экспрессии одного или нескольких генов, которые активируются в клетках, подвергающихся аутофагии, например, одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из ABL1, ACBD5, ACIN1, ACTRT1, ADAMTS7, AKR1E2, ALKBH5, ALPK1, AMBRA1, ANXA5, ANXA7, ARSB, ASB2, ATG10, ATG12, ATG13, ATG14, ATG16L1, ATG16L2, ATG2A, ATG2B, ATG3, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG5, ATG7, ATG9A, ATG9B, ATP13A2, ATP1B1, ATPAF1-AS1, ATPIF1, BECN1, BECN1P1, BLOC1S1, BMP2KL, BNIP1, BNIP3, BOC, C11orf2, C11orf41, C12orf44, C12orf5, C14orf133, C1orf210, C5, C6orf106, C7orf59, C7orf68, C8orf59, C9orf72, CA7, CALCB, CALCOCO2, CAPS, CCDC36, CD163L1, CD93, CDC37, CDKN2A, CHAF1B, CHMP2A, CHMP2B, CHMP3, CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C, CHMP6, CHST3, CISD2, CLDN7, CLEC16A, CLN3, CLVS1, COX8A, CPA3, CRNKL1, CSPG5, CTSA, CTSB, CTSD, CXCR7, DAP, DKKL1, DNAAF2, DPF3, DRAM1, DRAM2, DYNLL1, DYNLL2, DZANK1, EI24, EIF2S1, EPG5, EPM2A, FABP1, FAM125A, FAM131B, FAM134B, FAM13B, FAM176A, FAM176B, FAM48A, FANCC, FANCF, FANCL, FBXO7, FCGR3B, FGF14, FGF7, FGFBP1, FIS1, FNBP1L, FOXO1, FUNDC1, FUNDC2, FXR2, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, GABARAPL3, GABRA5, GDF5, GMIP, HAP1, HAPLN1, HBXIP, HCAR1, HDAC6, HGS, HIST1H3A, HIST1H3B, HIST1H3C, HIST1H3D, HIST1H3E, HIST1H3F, HIST1H3G, HIST1H3H, HIST1H3I, HIST1H3J, HK2, HMGB1, HPR, HSF2BP, HSP90AA1, HSPA8, IFI16, IPPK, IRGM, IST1, ITGB4, ITPKC, KCNK3, KCNQ1, KIAA0226, KIAA1324, KRCC1, KRT15, KRT73, LAMP1, LAMP2, LAMTOR1, LAMTOR2, LAMTOR3, LARP1B, LENG9, LGALS8, LIX1, LIX1L, LMCD1, LRRK2, LRSAM1, LSM4, MAP1A, MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3B2, MAP1LC3C, MAP1S, MAP2K1, MAP3K12, MARK2, MBD5, MDH1, MEX3C,

MFN1, MFN2, MLST8, MRPS10, MRPS2, MSTN, MTERFD1, MTMR14, MTMR3, MTOR, MTSS1, MYH11, MYLK, MYOM1, NBR1, NDUFB9, NEFM, NHLRC1, NME2, NPC1, NR2C2, NRBF2, NTHL1, NUP93, OBSCN, OPTN, P2RX5, PACS2, PARK2, PARK7, PDK1, PDK4, PEX13, PEX3, PFKP, PGK2, PHF23, PHYHIP, PI4K2A, PIK3C3, PIK3CA, PIK3CB, PIK3R4, PINK1, PLEKHM1, PLOD2, PNPO, PPARGC1A, PPY, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1, PRKAG2, PRKAG3, PRKD2, PRKG1, PSEN1, PTPN22, RAB12, RAB1A, RAB1B, RAB23, RAB24, RAB33B, RAB39, RAB7A, RB1CC1, RBM18, REEP2, REP15, RFWD3, RGS19, RHEB, RIMS3, RNF185, RNF41, RPS27A, RPTOR, RRAGA, RRAGB, RRAGC, RRAGD, S100A8, S100A9, SCN1A, SERPINB10, SESN2, SFRP4, SH3GLB1, SIRT2, SLC1A3, SLC1A4, SLC22A3, SLC25A19, SLC35B3, SLC35C1, SLC37A4, SLC6A1, SLCO1A2, SMURF1, SNAP29, SNAPIN, SNF8, SNRPB, SNRPB2, SNRPD1, SNRPF, SNTG1, SNX14, SPATA18, SQSTM1, SRPX, STAM, STAM2, STAT2, STBD1, STK11, STK32A, STOM, STX12, STX17, SUPT3H, TBC1D17, TBC1D25, TBC1D5, TCIRG1, TEAD4, TECPR1, TECPR2, TFEB, TM9SF1, TMBIM6, TMEM203, TMEM208, TMEM39A, TMEM39B, TMEM59, TMEM74, TMEM93, TNIK, TOLLIP, TOMM20, TOMM22, TOMM40, TOMM5, TOMM6, TOMM7, TOMM70A, TP53INP1, TP53INP2, TRAPPC8, TREM1, TRIM17, TRIM5, TSG101, TXLNA, UBA52, UBB, UBC, UBQLN1, UBQLN2, UBQLN4, ULK1, ULK2, ULK3, USP10, USP13, USP30, UVRAG, VAMP7, VAMP8, VDAC1, VMP1, VPS11, VPS16, VPS18, VPS25, VPS28, VPS33A, VPS33B, VPS36, VPS37A, VPS37B, VPS37C, VPS37D, VPS39, VPS41, VPS4A, VPS4B, VTA1, VTI1A, VTI1B, WDFY3, WDR45, WDR45L, WIPI1, WIPI2, XBP1, YIPF1, ZCCHC17, ZFYVE1, ZKSCAN3, ZNF189, ZNF593 и ZNF681. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые при аутофагии) определяют с помощью секвенирования РНК, например, секвенирования РНК одиночных клеток (scRNA-seq), как, например, проиллюстрировано в примере 10 в отношении фиг. 39E. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые при аутофагии) рассчитывают с использованием среднего логарифмически нормализованного значения экспрессии гена для всех генов в наборе генов.

Используемый в данном документе термин "балл набора генов (активируемые в покоящемся состоянии относительно подавляемых в активированном состоянии)" для клетки относится к баллу, который отражает степень, в которой клетка демонстрирует фенотип покоящейся Т-клетки по сравнению с фенотипом активированной Т-клетки. Более высокий балл набора генов (активируемые в покоящемся состоянии относительно подавляемых в активированном состоянии) указывает на увеличение выраженности фенотипа покоящихся Т-клеток, тогда как более низкий балл набора генов (активируемые в покоящемся состоянии относительно подавляемых в активированном состоянии) указывает на увеличение выраженности фенотипа активированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в покоящемся состоянии относительно подавляемых в активированном состоянии) определяют путем измерения экспрессии одного или нескольких генов, которые активируются в покоящихся Т-клетках

и/или подавляются в активированных Т-клетках, например, одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из ABCA7, ABCF3, ACAP2, AMT, ANKH, ATF7IP2, ATG14, ATP1A1, ATXN7, ATXN7L3B, BCL7A, BEX4, BSDC1, BTG1, BTG2, BTN3A1, C11orf21, C19orf22, C21orf2, CAMK2G, CARS2, CCNL2, CD248, CD5, CD55, CEP164, CHKB, CLK1, CLK4, CTSL1, DBP, DCUN1D2, DENND1C, DGKD, DLG1, DUSP1, EAPP, ECE1, ECHDC2, ERBB2IP, FAM117A, FAM134B, FAM134C, FAM169A, FAM190B, FAU, FLJ10038, FOXJ2, FOXJ3, FOXL1, FOXO1, FXYD5, FYB, HLA-E, HSPA1L, HYAL2, ICAM2, IFIT5, IFITM1, IKBKB, IQSEC1, IRS4, KIAA0664L3, KIAA0748, KLF3, KLF9, KRT18, LEF1, LINC00342, LIPA, LIPT1, LLGL2, LMBR1L, LPAR2, LTBP3, LYPD3, LZTFL1, MANBA, MAP2K6, MAP3K1, MARCH8, MAU2, MGEA5, MMP8, MPO, MSL1, MSL3, MYH3, MYLIP, NAGPA, NDST2, NISCH, NKTR, NLRP1, NOSIP, NPIP, NUMA1, PAIP2B, PAPD7, PBXIP1, PCIF1, PI4KA, PLCL2, PLEKHA1, PLEKHF2, PNISR, PPFIBP2, PRKCA, PRKCZ, PRKD3, PRMT2, PTP4A3, PXN, RASA2, RASA3, RASGRP2, RBM38, REPIN1, RNF38, RNF44, ROR1, RPL30, RPL32, RPLP1, RPS20, RPS24, RPS27, RPS6, RPS9, RXRA, RYK, SCAND2, SEMA4C, SETD1B, SETD6, SETX, SF3B1, SH2B1, SLC2A4RG, SLC35E2B, SLC46A3, SMAGP, SMARCE1, SMPD1, SNPH, SP140L, SPATA6, SPG7, SREK1IP1, SRSF5, STAT5B, SVIL, SYF2, SYNJ2BP, TAF1C, TBC1D4, TCF20, TECTA, TES, TMEM127, TMEM159, TMEM30B, TMEM66, TMEM8B, TP53TG1, TPCN1, TRIM22, TRIM44, TSC1, TSC22D1, TSC22D3, TSPYL2, TTC9, TTN, UBE2G2, USP33, USP34, VAMP1, VILL, VIPR1, VPS13C, ZBED5, ZBTB25, ZBTB40, ZC3H3, ZFP161, ZFP36L1, ZFP36L2, ZHX2, ZMYM5, ZNF136, ZNF148, ZNF318, ZNF350, ZNF512B, ZNF609, ZNF652, ZNF83, ZNF862 и ZNF91. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в покоящемся состоянии относительно подавляемых в активированном состоянии) определяют с помощью секвенирования РНК, например, секвенирования РНК одиночных клеток (scRNA-seq), как, например, проиллюстрировано в примере 10 в отношении фиг. 38D. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в покоящемся состоянии относительно подавляемых в активированном состоянии) рассчитывают с использованием среднего логарифмически нормализованного значения экспрессии гена для всех генов в наборе генов.

Используемый в данном документе термин "балл набора генов (постепенно активируемые при дифференцировке в клетки памяти)" для клетки относится к баллу, который отражает стадию дифференцировки в клетки памяти. Более высокий балл набора генов (постепенно активируемые при дифференцировке в клетки памяти) указывает на увеличение выраженности фенотипа поздних Т-клеток памяти, тогда как более низкий балл набора генов (постепенно активируемые при дифференцировке в клетки памяти) указывает на увеличение выраженности фенотипа ранних Т-клеток памяти. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые при аутофагии) определяют путем измерения экспрессии одного или нескольких генов, которые активируются в ходе дифференцировки в клетки памяти, например, одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из MTCH2, RAB6C, KIAA0195, SETD2, C2orf24, NRD1, GNA13,

COPA, SELT, TNIP1, CBFA2T2, LRP10, PRKCI, BRE, ANKS1A, PNPLA6, ARL6IP1, WDFY1, MAPK1, GPR153, SHKBP1, MAP1LC3B2, PIP4K2A, HCN3, GTPBP1, TLN1, C4orf34, KIF3B, TCIRG1, PPP3CA, ATG4D, TYMP, TRAF6, C17orf76, WIPF1, FAM108A1, MYL6, NRM, SPCS2, GGT3P, GALK1, CLIP4, ARL4C, YWHAQ, LPCAT4, ATG2A, IDS, TBC1D5, DMPK, ST6GALNAC6, REEP5, ABHD6, KIAA0247, EMB, TSEN54, SPIRE2, PIWIL4, ZSCAN22, ICAM1, CHD9, LPIN2, SETD8, ZC3H12A, ULBP3, IL15RA, HLA-DQB2, LCP1, CHP, RUNX3, TMEM43, REEP4, MEF2D, ABL1, TMEM39A, PCBP4, PLCD1, CHST12, RASGRP1, C1orf58, C11orf63, C6orf129, FHOD1, DKFZp434F142, PIK3CG, ITPR3, BTG3, C4orf50, CNNM3, IFI16, AK1, CDK2AP1, REL, BCL2L1, MVD, TTC39C, PLEKHA2, FKBP11, EML4, FANCA, CDCA4, FUCA2, MFSD10, TBCD, CAPN2, IQGAP1, CHST11, PIK3R1, MYO5A, KIR2DL3, DLG3, MXD4, RALGDS, S1PR5, WSB2, CCR3, TIPARP, SP140, CD151, SOX13, KRTAP5-2, NF1, PEA15, PARP8, RNF166, UEVLD, LIMK1, CACNB1, TMX4, SLC6A6, LBA1, SV2A, LLGL2, IRF1, PPP2R5C, CD99, RAPGEF1, PPP4R1, OSBPL7, FOXP4, SLA2, TBC1D2B, ST7, JAZF1, GGA2, PI4K2A, CD68, LPGAT1, STX11, ZAK, FAM160B1, RORA, C8orf80, APOBEC3F, TGFBI, DNAJC1, GPR114, LRP8, CD69, CMIP, NAT13, TGFB1, FLJ00049, ANTXR2, NR4A3, IL12RB1, NTNG2, RDX, MLLT4, GPRIN3, ADCY9, CD300A, SCD5, ABI3, PTPN22, LGALS1, SYTL3, BMPR1A, TBK1, PMAIP1, RASGEF1A, GCNT1, GABARAPL1, STOM, CALHM2, ABCA2, PPP1R16B, SYNE2, PAM, C12orf75, CLCF1, MXRA7, APOBEC3C, CLSTN3, ACOT9, HIP1, LAG3, TNFAIP3, DCBLD1, KLF6, CACNB3, RNF19A, RAB27A, FADS3, DLG5, APOBEC3D, TNFRSF1B, ACTN4, TBKBP1, ATXN1, ARAP2, ARHGEF12, FAM53B, MAN1A1, FAM38A, PLXNC1, GRLF1, SRGN, HLA-DRB5, B4GALT5, WIPI1, PTPRJ, SLFN11, DUSP2, ANXA5, AHNAK, NEO1, CLIC1, EIF2C4, MAP3K5, IL2RB, PLEKHG1, MYO6, GTDC1, EDARADD, GALM, TARP, ADAM8, MSC, HNRPLL, SYT11, ATP2B4, NHSL2, MATK, ARHGAP18, SLFN12L, SPATS2L, RAB27B, PIK3R3, TP53INP1, MBOAT1, GYG1, KATNAL1, FAM46C, ZC3HAV1L, ANXA2P2, CTNNA1, NPC1, C3AR1, CRIM1, SH2D2A, ERN1, YPEL1, TBX21, SLC1A4, FASLG, PHACTR2, GALNT3, ADRB2, PIK3AP1, TLR3, PLEKHA5, DUSP10, GNAO1, PTGDR, FRMD4B, ANXA2, EOMES, CADM1, MAF, TPRG1, NBEAL2, PPP2R2B, PELO, SLC4A4, KLRF1, FOSL2, RGS2, TGFBR3, PRF1, MYO1F, GAB3, C17orf66, MICAL2, CYTH3, TOX, HLA-DRA, SYNE1, WEE1, PYHIN1, F2R, PLD1, THBS1, CD58, FAS, NETO2, CXCR6, ST6GALNAC2, DUSP4, AUTS2, C1orf21, KLRG1, TNIP3, GZMA, PRR5L, PRDM1, ST8SIA6, PLXND1, PTPRM, GFPT2, MYBL1, SLAMF7, FLJ16686, GNLY, ZEB2, CST7, IL18RAP, CCL5, KLRD1 и KLRB1. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (постепенно активируемые при дифференцировке в клетки памяти) определяют с помощью секвенирования РНК, например, секвенирования РНК одиночных клеток (scRNA-seq), как, например, проиллюстрировано в примере 10 в отношении фиг. 40B. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (постепенно активируемые при дифференцировке в клетки памяти) рассчитывают с использованием среднего логарифмически нормализованного значения экспрессии гена для всех генов в наборе

генов.

Используемый в данном документе термин "балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TN)" для клетки относится к баллу, который отражает степень, в которой клетка демонстрирует фенотип эффекторной Т-клетки памяти (TEM) по сравнению с фенотипом необученной Т-клетки (TN). Более высокий балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TN) указывает на увеличение выраженности фенотипа TEM, тогда как более низкий балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TN) указывает на увеличение выраженности фенотипа TN. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TN) определяют путем измерения экспрессии одного или нескольких генов, которые активируются в TEM-клетках и/или подавляются в TN-клетках, например, одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из MYO5A, MXD4, STK3, S1PR5, GLCCI1, CCR3, SOX13, KRTAP5-2, PEA15, PARP8, RNF166, UEVLD, LIMK1, SLC6A6, SV2A, KPNA2, OSBPL7, ST7, GGA2, PI4K2A, CD68, ZAK, RORA, TGFBI, DNAJC1, JOSD1, ZFYVE28, LRP8, OSBPL3, CMIP, NAT13, TGFB1, ANTXR2, NR4A3, RDX, ADCY9, CHN1, CD300A, SCD5, PTPN22, LGALS1, RASGEF1A, GCNT1, GLUL, ABCA2, CLDND1, PAM, CLCF1, MXRA7, CLSTN3, ACOT9, METRNL, BMPR1A, LRIG1, APOBEC3G, CACNB3, RNF19A, RAB27A, FADS3, ACTN4, TBKBP1, FAM53B, MAN1A1, FAM38A, GRLF1, B4GALT5, WIPI1, DUSP2, ANXA5, AHNAK, CLIC1, MAP3K5, ST8SIA1, TARP, ADAM8, MATK, SLFN12L, PIK3R3, FAM46C, ANXA2P2, CTNNA1, NPC1, SH2D2A, ERN1, YPEL1, TBX21, STOM, PHACTR2, GBP5, ADRB2, PIK3AP1, DUSP10, PTGDR, EOMES, MAF, TPRG1, NBEAL2, NCAPH, SLC4A4, FOSL2, RGS2, TGFBR3, MYO1F, C17orf66, CYTH3, WEE1, PYHIN1, F2R, THBS1, CD58, AUTS2, FAM129A, TNIP3, GZMA, PRR5L, PRDM1, PLXND1, PTPRM, GFPT2, MYBL1, SLAMF7, ZEB2, CST7, CCL5, GZMK и KLRB1. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TN) определяют с помощью секвенирования РНК, например, секвенирования РНК одиночных клеток (scRNA-seq), как, например, проиллюстрировано в примере 10 в отношении фиг. 40C. В некоторых вариантах осуществления балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) рассчитывают с использованием среднего логарифмически нормализованного значения экспрессии гена для всех генов в наборе генов.

Применительно к значениям балла набора генов (например, медианным значениям балла набора генов), если положительный балл набора генов уменьшить на 100%, получим значение 0. Если отрицательный балл набора генов увеличить на 100%, получим значение 0. Например, на фиг. 39A медианный балл набора генов для образца в день 1 составляет -0,084; медианный балл набора генов для образца в день 9 составляет 0,035; и медианный балл набора генов для исходного образца составляет -0,1. На фиг. 39A увеличение медианного балла набора генов для исходного образца на 100% приводит к получению значения балла набора генов, составляющего 0; и увеличение медианного

балла набора генов для исходного образца на 200% приводит к получению значения балла набора генов, составляющего 0,1. На фиг. 39A уменьшение медианного балла набора генов для образца в день 9 на 100% приводит к получению значения балла набора генов, составляющего 0; и уменьшение медианного балла набора генов для образца в день 9 на 200% приводит к получению значения балла набора генов, составляющего -0,035.

Используемый в данном документе термин "гранула" относится к дискретной частице с твердой поверхностью, размер которой находится в пределах от примерно 0,1 мкм до нескольких миллиметров в диаметре. Гранулы могут быть сферическими (например, микросферы) или иметь неправильную форму. Гранулы могут содержать различные материалы, включающие без ограничения парамагнитные материалы, керамику, пластик, стекло, полистирол, метилстирол, акриловые полимеры, титан, латекс, Sepharose™, целлюлозу, нейлон и т. п. В некоторых вариантах осуществления гранулы представляют собой относительно однородные сферические суперпарамагнитные полистирольные гранулы диаметром приблизительно 4,5 мкм, например, покрытые смесью антител к CD3 (например, CD3-эпсилон) и CD28, например, ковалентно связанные с ней. В некоторых вариантах осуществления гранулы представляют собой Dynabeads®. В некоторых вариантах осуществления как антитела к CD3, так и антитела к CD28, связаны с одной и той же гранулой, имитируя стимуляцию Т-клетки антигенпрезентирующими клетками. Свойство Dynabeads® и применение Dynabeads® для выделения и размножения клеток хорошо известны из уровня техники, например, см., Neurauter et al., Cell isolation and expansion using Dynabeads, Adv Biochem Eng Biotechnol. 2007; 106:41-73, включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Используемый в данном документе термин "наноматрица" относится к наноструктуре, содержащей матрицу из подвижных полимерных цепей. Размер наноматрицы составляет от 1 до 500 нм, например, от 10 до 200 нм. В некоторых вариантах осуществления матрица из подвижных полимерных цепей присоединена к одному или нескольким агонистам, которые передают сигналы активации к Т-клеткам, например, агонистическим антителам к CD3 и/или антитела к CD28. В некоторых вариантах осуществления наноматрица предусматривает коллоидную полимерную наноматрицу, присоединенную, например, ковалентно присоединенную, к агонисту одной или нескольких стимулирующих молекул и/или агонисту одной или нескольких костимулирующих молекул. В некоторых вариантах осуществления агонист одной или нескольких стимулирующих молекул представляет собой агонист CD3 (например, агонистическое антитело к CD3). В некоторых вариантах осуществления агонист одной или нескольких костимулирующих молекул представляет собой агонист CD28 (например, агонистическое антитело к CD28). В некоторых вариантах осуществления наноматрица характеризуется отсутствием твердой поверхности, например, в качестве точки присоединения агонистов, таких как антитела к CD3 и/или антитела к CD28. В некоторых вариантах осуществления наноматрица представляет собой наноматрицу, раскрытую в WO2014/048920A1 или предоставляемую в наборе MACS® GMP TransAct™ для Т-клеток

от Miltenyi Biotec GmbH, включенных в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. MACS® GMP TransAct™ для Т-клеток состоит из коллоидной полимерной наноматрицы, ковалентно присоединенной к гуманизированным рекомбинантным агонистическим антителам к CD3 и CD28 человека.

Ниже более подробно описаны различные варианты осуществления композиций и способов, представленных в данном документе. Дополнительные определения изложены по всему тексту настоящего описания.

Описание

В данном документе предусмотрены способы изготовления иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток), сконструированных таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, например, CAR, описанный в данном документе, композиции, содержащие такие клетки, и способы применения таких клеток для лечения заболевания, такого как рак, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления посредством способов, раскрытых в данном документе, можно изготавливать иммунные эффекторные клетки, сконструированные таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, за менее чем 24 часа. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что способы, предусмотренные в данном документе, обеспечивают сохранение недифференцированного фенотипа Т-клеток, таких как необученные Т-клетки, в ходе процесса изготовления. Такие клетки, экспрессирующие CAR, с недифференцированным фенотипом могут персистировать дольше и/или размножаться лучше in vivo после инфузии. В некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетки, полученные посредством способов изготовления, предусмотренных в данном документе, содержат более высокую процентную долю Т-клеток памяти, представляющих собой стволовые клетки, по сравнению с CAR-Т-клетками, полученными посредством способа традиционного изготовления, например, согласно измерению с помощью scRNA-seq (например, согласно измерению посредством способов, описанных в примере 10 в отношении фиг. 39A). В некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетки, полученные посредством способов изготовления, предусмотренных в данном документе, содержат более высокую процентную долю эффекторных Т-клеток по сравнению с CAR-Т-клетками, полученными посредством способа традиционного изготовления, например, согласно измерению с помощью scRNA-seq (например, согласно измерению посредством способов, описанных в примере 10 в отношении фиг. 39B). В некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетки, полученные посредством способов изготовления, предусмотренных в данном документе, лучше сохраняют стволовость Т-клеток по сравнению с CAR-Т-клетками, полученными посредством способа традиционного изготовления, например, согласно измерению с помощью scRNA-seq (например, согласно измерению посредством способов, описанных в примере 10 в отношении фиг. 39C). В некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетки, полученные посредством способов изготовления, предусмотренных в данном документе, демонстрируют более низкий уровень гипоксии по сравнению с CAR-Т-клетками, полученными посредством способа традиционного изготовления, например, согласно

измерению с помощью scRNA-seq (например, согласно измерению посредством способов, описанных в примере 10 в отношении фиг. 39D). В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетки, полученные посредством способов изготовления, предусмотренных в данном документе, демонстрируют более низкий уровень аутофагии по сравнению с CAR-T-клетками, полученными посредством способа традиционного изготовления, например, согласно измерению с помощью scRNA-seq (например, согласно измерению посредством способов, описанных в примере 10 в отношении фиг. 39E).

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, не предусматривают применение гранулы, такой как Dynabeads® (например, Dynabeads® с антителами к CD3/CD28), и не предусматривают стадию удаления гранул. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетки, изготовленные посредством способов, раскрытых в данном документе, можно вводить субъекту при минимальном размножении ex vivo, например, в течение менее 1 дня, менее 12 часов, менее 8 часов, менее 6 часов, менее 4 часов, менее 3 часов, менее 2 часов, менее 1 часа, или без размножения ex vivo. Соответственно, способы, описанные в данном документе, предусматривают способ быстрого изготовления для получения улучшенных продуктов на основе клеток, экспрессирующих CAR, для применения в лечении заболевания у субъекта.

Способ с использованием цитокинов

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), включающие (1) приведение популяции клеток в контакт с цитокином, выбранным из IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-6 или их комбинации, (2) приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей CAR, за счет чего обеспечивается получение популяции клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и (3) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторного составления популяции клеток в среде для криоконсервации) или введения, где (a) стадию (2) проводят вместе со стадией (1) или не позже чем через 5 часов после начала стадии (1), например, не позже чем через 1, 2, 3, 4 или 5 часов после начала стадии (1), и стадию (3) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (1), например, не позже чем через 22, 23 или 24 часа после начала стадии (1), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (1), или (b) популяция клеток из стадии (3) не является размножившейся или является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в вирусном векторе, например, вирусном векторе, выбранном из

лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в невирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в плазмиде. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) не находится в каком-либо векторе. В некоторых вариантах осуществления стадия (2) включает трансдукцию популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления стадия (2) дополнительно включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с shRNA, которая целенаправленно воздействует на Tet2, содержащей (A) смысловую нить, содержащую последовательность-мишень Tet2, и (B) антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично, или вектором, кодирующим shRNA. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит последовательность-мишень Tet2 GGGTAAGCCAAGAAAGAAA (SEQ ID NO: 418). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит последовательность, обратно комплементарную ей, т. е. TTTCTTTCTTGGCTTACCC (SEQ ID NO: 419). В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий shRNA, является таким же, как вектор, кодирующий CAR, или отличается от него. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий последовательность shRNA, содержит промотор (такой как, без ограничения, промотор U6), смысловую нить, содержащую последовательность-мишень Tet2, петлю, антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично, и необязательно поли(Т)-хвост, например, последовательности из **таблицы 29**.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток (например, Т-клеток) собирают из образца, полученного путем афереза (например, образца, полученного путем лейкафереза) у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкафереза), собирают у субъекта и транспортируют в виде замороженного образца (например, криоконсервированного образца) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Затем замороженный образец, полученный путем афереза, размораживают, и Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) отбирают из образца, полученного путем афереза, например, с помощью устройства для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS® Prodigy®). Отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) затем высевают для изготовления CART посредством способа с использованием цитокинов, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в конце способа с использованием цитокинов CAR-Т-клетки криоконсервируют и впоследствии размораживают и вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) подвергают одному или нескольким циклам замораживания-размораживания перед высеванием для изготовления

CART.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкафереза), собирают у субъекта и транспортируют в виде свежего продукта (например, незамороженного продукта) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) отбирают из образца, полученного путем афереза, например, с помощью устройства для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS® Prodigy®). Отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) затем высевают для изготовления CART посредством способа с использованием цитокинов, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) подвергают одному или нескольким циклам замораживания-размораживания перед высеванием для изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта собирают образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкафереза). Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) отбирают из образца, полученного путем афереза, например, с помощью устройства для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS® Prodigy®). Отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) затем транспортируют в виде замороженного образца (например, криоконсервированного образца) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) впоследствии размораживают и высевают для изготовления CART посредством способа с использованием цитокинов, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления после высевания клеток (например, Т-клеток) к клеткам добавляют один или несколько цитокинов (например, один или несколько цитокинов, выбранных из IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-21 или IL-6 (например, IL-6/sIL-6R)), а также векторов (например, лентивирусных векторов), кодирующих CAR. После инкубирования в течение 20-24 часов клетки промывают и составляют для хранения или введения.

В отличие от традиционных подходов к изготовлению CART, способ с использованием цитокинов, предусмотренный в данном документе, не предусматривает стимуляцию CD3 и/или CD28 или размножение Т-клеток ex vivo. Т-клетки, которые приводятся в контакт с антителами к CD3 и антителами к CD28 и которые интенсивно размножаются ex vivo, склонны демонстрировать дифференцировку в направлении фенотипа центральных клеток памяти. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что способ с использованием цитокинов, предусмотренный в данном документе, обеспечивает сохранение или увеличение выраженности недифференцированного фенотипа Т-клеток в ходе изготовления CART, обеспечивая при этом получение продукта на основе CART, который может дольше персистировать после инфузии субъекту.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с

одним или несколькими цитокинами (например, одним или несколькими цитокинами, выбранными из IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-21 или IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra).

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2 и IL-7. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2 и IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7 и IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-21 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток дополнительно приводят в контакт с ингибитором LSD1. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток дополнительно приводят в контакт с ингибитором MALT1.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 ед/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нг/мл IL-7. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нг/мл IL-15.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток трансдуцируют молекулой ДНК, кодирующей CAR.

В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит одновременно с приведением популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами,

описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 часов после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 5 часов после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 4 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 3 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 2 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 1 час после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 72, 60, 48, 36, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 часов после начала приведения в контакт популяции клеток с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 26 часов после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 25 часов после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 24 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 23 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 22 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или

несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток не размножается ex vivo.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается на не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается на не более чем 5%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается на не более чем 15%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается на не более чем 20%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается на не более чем 25%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается на не более чем 30%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается на не более чем 35%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается на не более чем 40%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается за не более чем 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 36 или 48 часов, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток не приводят в контакт in vitro со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR (например, антителом к CD3), и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток (например, антителом к CD28), или, в

случае приведения в контакт, продолжительность стадии приведения в контакт составляет менее 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 часов.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт in vitro со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR (например, антителом к CD3), и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток (например, антителом к CD28), в течение 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 часов.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, изготовленная посредством способа с использованием цитокинов, предусмотренного в данном документе, демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток среди клеток, экспрессирующих CAR (например, на по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает приведение популяции клеток в контакт, например, со средством, которое связывает комплекс CD3/TCR (например, антителом к CD3), и/или средством, которое связывает костимулирующую молекулу на поверхности клеток (например, антителом к CD28).

В некоторых вариантах осуществления способ с использованием цитокинов в данном документе осуществляют в средах для клеток, содержащих не более 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 или 8% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления способ с использованием цитокинов, предусмотренный в данном документе, осуществляют в средах для клеток, содержащих ингибитор LSD1, ингибитор MALT1 или их комбинацию.

Способ с использованием активации

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), включающие (i) приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта лейкафереза) в контакт с (A) средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или (B) средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток; (ii) приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей CAR, за счет чего обеспечивается получение популяции клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и (iii) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторного составления популяции клеток в среде для криоконсервации) или введения, где: (a) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и стадию (iii) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 22, 23 или

24 часа после начала стадии (i), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (i); (b) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и стадию (iii) проводят не позже чем через 30, 36 или 48 часов после начала стадии (ii), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 часов после начала стадии (ii); или (c) популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в вирусном векторе, например, вирусном векторе, выбранном из лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в невирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в плазмиде. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) не находится в каком-либо векторе. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает трансдукцию популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления стадия (2) дополнительно включает приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с shRNA, которая целенаправленно воздействует на Tet2, содержащей (A) смысловую нить, содержащую последовательность-мишень Tet2, и (B) антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично, или вектором, кодирующим shRNA. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит последовательность-мишень Tet2 GGGTAAGCCAAGAAAGAAA. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит последовательность, обратно комплементарную ей, т. е. TTTCTTTCTTGGCTTACCC. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий shRNA, является таким же, как вектор, кодирующий CAR, или отличается от него. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий последовательность shRNA, содержит промотор (такой как, без ограничения, промотор U6), смысловую нить, содержащую последовательность-мишень Tet2, петлю, антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично, и необязательно поли(Т)-хвост, например, последовательности из **таблицы 29**.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток (например, Т-клеток) собирают из образца, полученного путем афереза (например, образца, полученного путем лейкафереза) у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкафереза), собирают у субъекта и транспортируют в виде замороженного образца (например, криоконсервированного образца) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Затем замороженный образец, полученный путем афереза, размораживают, и Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) отбирают из образца, полученного путем афереза, например, с помощью устройства для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS® Prodigy®). Отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) затем высевают для изготовления CART посредством способа с использованием активации, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) подвергают одному или нескольким циклам замораживания-размораживания перед высеванием для изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкафереза), собирают у субъекта и транспортируют в виде свежего продукта (например, незамороженного продукта) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) отбирают из образца, полученного путем афереза, например, с помощью устройства для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS® Prodigy®). Отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) затем высевают для изготовления CART посредством способа с использованием активации, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) подвергают одному или нескольким циклам замораживания-размораживания перед высеванием для изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта собирают образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкафереза). Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) отбирают из образца, полученного путем афереза, например, с помощью устройства для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS® Prodigy®). Отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) затем транспортируют в виде замороженного образца (например, криоконсервированного образца) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) впоследствии размораживают и высевают для изготовления CART посредством способа с использованием активации, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления клетки (например, Т-клетки) приводят в контакт с антителами к CD3 и антителами к CD28 в течение, например, 12 часов с последующей трансдукцией с помощью вектора (например, лентивирусного вектора), кодирующего CAR. Через 24 часа после начала культивирования клетки промывают и составляют для хранения или введения.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что кратковременная стимуляция CD3 и CD28 может способствовать эффективной трансдукции самообновляющихся Т-клеток. По сравнению с традиционными подходами к изготовлению CART способ с использованием активации, предусмотренный в данном документе, не предусматривает продолжительного размножения ex vivo. Подобно способу с использованием цитокинов, способ с использованием активации, предусмотренный в данном документе, также обеспечивает сохранение недифференцированных Т-клеток в ходе изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с (A) средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или (B) средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой средство, которое стимулирует CD3. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28, ICOS, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD226 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, выбрано из антитела (например, однодоменного антитела (например, антитела из одного вариабельного домена тяжелой цепи), пептитела, Fab-фрагмента или scFv), малой молекулы или лиганда (например, существующего в природе, рекомбинантного или химерного лиганда). В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, выбрано из антитела (например, однодоменного антитела (например, антитела из одного вариабельного домена тяжелой цепи), пептитела, Fab-фрагмента или scFv), малой молекулы или лиганда (например, существующего в природе, рекомбинантного или химерного лиганда). В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, не содержит гранулу. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, не содержит гранулу. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, содержит антитело к CD3. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит антитело к CD28. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, содержит антитело к CD3, ковалентно присоединенное к коллоидной полимерной наноматрице. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует CD3, содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов для CD3 или TCR, как, например, без ограничения, антитело или фрагмент антитела к CD3 или к TCR, содержащие одну или несколько их CDR, тяжелых цепей и/или легких цепей - такие как,

без ограничения, антитело к CD3 или к TCR, представленное в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит антитело к CD28, ковалентно присоединенное к коллоидной полимерной наноматрице. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RA, IL6RB или CD2. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов для CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RB и/или CD2, как, например, без ограничения, антитело или фрагмент антитела к CD28, к ICOS, к CD27, к CD25, к 4-1BB, к IL6RA, к IL6RB или к CD2, содержащие одну или несколько их CDR, тяжелых цепей и/или легких цепей - такие как, без ограничения, антитело к CD28, к ICOS, к CD27, к CD25, к 4-1BB, к IL6RA, к IL6RB или к CD2, представленное в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержат TransAct^{TM} для Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержатся в полиспецифической связывающей молекуле. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит антигенсвязывающий домен для CD3 и антигенсвязывающий домен для CD28 или CD2. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические связывающие молекулы содержат одну или несколько тяжелых и/или легких цепей - таких как, без ограничения, тяжелые и/или легкие цепи, представленные в таблице 28. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело имеет конфигурацию согласно любой из схем, представленных на **фиг. 50A**. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело является одновалентным или двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область биспецифического антитела подвергнута сайленсингу. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит множество биспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител являются одновалентными. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител содержат Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область одного или нескольких из множества биспецифических антител подвергнута сайленсингу. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител конъюгированы друг с другом в виде мультимера. В некоторых вариантах осуществления мультимер имеет конфигурацию согласно любой из схем, представленных на **фиг. 50B**.

В некоторых вариантах осуществления матрица содержит полимерный, например, биоразлагаемый или биосовместимый, инертный материал, например, который является нетоксичным для клеток, или состоит из такого материала. В некоторых вариантах осуществления матрица состоит из гидрофильных полимерных цепей, которые достигают максимальной подвижности в водном растворе благодаря гидратации цепей. В некоторых вариантах осуществления подвижная матрица может состоять из композиций на основе коллагена, очищенных белков, очищенных пептидов, полисахаридов, гликозаминогликанов или внеклеточного матрикса. Полисахарид может включать, например, простые эфиры целлюлозы, крахмал, аравийскую камедь, агарозу, декстран, хитозан, гиалуроновую кислоту, пектины, ксантан, гуаровую камедь или альгинат. Другие полимеры могут включать сложные полиэфиры, простые полиэфиры, полиакрилаты, полиакриламиды, полиамины, полиэтиленимины, полимеры поликватерниумы, полифосфазены, поливиниловые спирты, поливинилацетаты, поливинилпирролидоны, блок-сополимеры или полиуретаны. В некоторых вариантах осуществления подвижная матрица представляет собой полимер декстран.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток трансдуцируют молекулой ДНК, кодирующей CAR.

В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит одновременно с приведением популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0,5 часа после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 20 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 19 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток

в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 18 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 17 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 16 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 15 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 14 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 14 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 13 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 12 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток

в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 11 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 10 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 9 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 8 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 7 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 6 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 5 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 4 часа после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток

в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 3 часа после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 2 часа после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 1 час после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 30 минут после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 72, 60, 48, 36, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 26 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 25 часов после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 24 часа после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности

клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 23 часа после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 22 часа после начала приведения популяции клеток в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток не размножается ex vivo.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается с увеличением численности на не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается с увеличением численности на не более чем 5%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается с увеличением численности на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается с увеличением численности на не более чем 15%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается с увеличением численности на не более чем 20%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается с увеличением численности на не более чем 25%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует

комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается с увеличением численности на не более чем 30%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается с увеличением численности на не более чем 35%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается с увеличением численности на не более чем 40%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток размножается за не более чем 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 36 или 48 часов, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления способ с использованием активации осуществляют в бессывороточных средах для клеток. В некоторых вариантах осуществления способ с использованием активации осуществляют в средах для клеток, содержащих один или несколько цитокинов, выбранных из IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления hetIL-15 содержит аминокислотную последовательность NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSITCPPPMS VEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDP ALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQG (SEQ ID NO: 309). В некоторых вариантах осуществления hetIL-15 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 309. В некоторых вариантах осуществления способ с использованием активации осуществляют в средах для клеток, содержащих ингибитор LSD1. В некоторых вариантах осуществления способ с использованием активации осуществляют в средах для клеток, содержащих ингибитор MALT1. В некоторых вариантах осуществления бессывороточные среды для клеток содержат заменитель сыворотки. В некоторых вариантах осуществления заменитель сыворотки

представляет собой заменитель сыворотки для иммунных клеток (ICSR) CTS™. В некоторых вариантах осуществления уровень ICSR может составлять, например, вплоть до 5%, например, приблизительно 1%, 2%, 3%, 4% или 5%. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что применение сред для клеток, например, сред для быстрого изготовления, показанных в таблице 21 или таблице 25, содержащих ICSR, например, 2% ICSR, может обеспечивать улучшение жизнеспособности клеток в ходе способа изготовления, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), включающие (a) получение образца, полученного путем афереза (например, свежего или криоконсервированного образца, полученного путем лейкафереза), собранного у субъекта; (b) отбор Т-клеток из образца, полученного путем афереза (например, с помощью отрицательного отбора, положительного отбора или отбора без гранул); (c) высевание выделенных Т-клеток при, например, от 1×10^6 до 1×10^7 клеток/мл; (d) приведение Т-клеток в контакт со средством, которое стимулирует Т-клетки, например, средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста на поверхности клеток (например, приведение Т-клеток в контакт с антителом к CD3 и/или антителом к CD28, например, приведение Т-клеток в контакт с TransAct); (e) приведение Т-клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей CAR (например, приведение Т-клеток в контакт с вирусом, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR), в течение, например, 6-48 часов, например, 20-28 часов; и (f) промывание и сбор Т-клеток для хранения (например, повторного составления Т-клеток в среде для криоконсервации) или введения. В некоторых вариантах осуществления стадию (f) проводят не позже чем через 30, 36 или 48 часов после начала стадии (d) или (e), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48 часов после начала стадии (d) или (e).

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов способы осуществляют в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления все из отделения, активации, трансдукции, инкубирования и промывания Т-клеток проводят в закрытой системе. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов способы осуществляют в отдельных устройствах. В некоторых вариантах осуществления отделение, активацию, трансдукцию, инкубирование и промывание Т-клеток проводят в отдельных устройствах.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов способы дополнительно включают добавление вспомогательного вещества или реагента, усиливающего трансдукцию, в среду для культивирования клеток для повышения эффективности трансдукции. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество или реагент, усиливающий трансдукцию, содержит катионный полимер. В

некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество или реагент, усиливающий трансдукцию, выбраны из LentiBOOST™ (Sirion Biotech), вектофусина-1, F108 (полоксамера 338 или Pluronic® F-38), сульфата протамина, бромида гексадиметрина (полибрена), PEA, Pluronic F68, Pluronic F127, Synperonic или LentiTrans™. В некоторых вариантах осуществления реагент, усиливающий трансдукцию, представляет собой LentiBOOST™ (Sirion Biotech). В некоторых вариантах осуществления реагент, усиливающий трансдукцию, представляет собой F108 (полоксамер 338 или Pluronic® F-38).

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов трансдукция популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора включает воздействие на популяцию клеток и вирусный вектор центробежной силы в условиях, при которых повышается эффективность трансдукции. В одном варианте осуществления клетки трансдуцируют путем спинокуляции.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов клетки (например, Т-клетки) активируют и трансдуцируют в колбе для культивирования клеток, содержащей газопроницаемую мембрану в основании, которая предоставляет возможность работы с большими объемами сред без существенного нарушения газообмена. В некоторых вариантах осуществления рост клеток достигается путем предоставления доступа, например, по существу непрерывного доступа, к питательным веществам посредством конвекции.

Молекулы антител к CD28

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28, например, антитело к CD28, которое должно применяться в полиспецифической связывающей молекуле, описанной в данном документе, содержит по меньшей мере одну антигенсвязывающую область, например, вариабельную область или ее антигенсвязывающий фрагмент, из антитела к CD28 (2), описанного в **таблице 27.** В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к CD28 содержит одну или две вариабельные области из антитела к CD28 (2), описанного в **таблице 27**. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 538, 539, 540, 530, 531 и 532 соответственно; HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 541, 539, 540, 530, 531 и 532 соответственно; HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 542, 543, 540, 533, 534 и 535 соответственно; или HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 544, 545, 546, 536, 534 и 532 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к CD28 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 547 или 548 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 547 или 548. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28 содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 537 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28 содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 547 и 537 соответственно или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28 содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 548 и 537 соответственно или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей.

Понятно, что антитело к CD28, описанное в данном документе, может применяться в контексте полиспецифической связывающей молекулы, например, с дополнительным связывающим доменом, например, доменом, связывающим CD3, описанным в данном документе. Также понятно, что антитело к CD28, описанное в данном документе, может применяться в других контекстах, например, в качестве моноспецифического антитела.

Реагенты, представляющие собой полиспецифические связывающие молекулы

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой средство, которое стимулирует CD3. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует CD3, содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов для CD3 или TCR, как, например, без ограничения, антитело или фрагмент антитела к CD3 или к TCR, содержащие одну или несколько их CDR, VH, тяжелых цепей, VL и/или легких цепей.

Последовательности антител к CD3 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD3 наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в **таблице 27**. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 437 и 427 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 456 и 445 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 457 и 446 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности

под SEQ ID NO: 475 и 467 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 476 и 468 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 494 и 484 соответственно.

Последовательности антител к TCR и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к TCR наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в **таблице 27**.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RA, IL6RB или CD2. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов для CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RB и/или CD2, как, например, без ограничения, антитело или фрагмент антитела к CD28, к ICOS, к CD27, к CD25, к 4-1BB, к IL6RA, к IL6RB или к CD2, содержащие одну или несколько их CDR, тяжелых цепей и/или легких цепей.

Последовательности антител к CD28 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD28 наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH, VL, HC и LC представлены в **таблице 27**. Последовательности антител к ICOS и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к ICOS наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH, VL и LC представлены в **таблице 27**.

Последовательности антител к CD27 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD27 наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в **таблице 27**.

Последовательности антител к CD25 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD25 наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH, VL, HC и LC представлены в **таблице 27**.

Последовательности антител к 4-1BB и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к 4-1BB наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в **таблице 27**.

Последовательности антител к IL6RA и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к IL6RA наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в

таблице 27.

Последовательности антител к IL6RB и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к IL6RB наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в **таблице 27**.

Последовательности антител к CD2 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD2 наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH, VL, HC и LC представлены в **таблице 27**.

Таблица 27 - Иллюстративные последовательности антител, CDR, вариабельных областей тяжелой цепи (VH), вариабельных областей легкой цепи (VL), тяжелых цепей (HC) и легких цепей (LC) по антигену-мишени

SEQ ID NO	Описание	Аминокислотная последовательность
Антитело к CD3 (1)		
SEQ ID NO: 420 (комбинированная)	LCDR1	SASSSVSYMN
SEQ ID NO: 421 (комбинированная)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 422 (комбинированная)	LCDR3	QQWSSNPFT
SEQ ID NO: 420 (Kabat)	LCDR1	SASSSVSYMN
SEQ ID NO: 421 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 422 (Kabat)	LCDR3	QQWSSNPFT
SEQ ID NO: 423 (Chothia)	LCDR1	SSSVSY
SEQ ID NO: 424 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 425 (Chothia)	LCDR3	WSSNPF
SEQ ID NO: 426 (IMGT)	LCDR1	SSVSY
SEQ ID NO: 424 (IMGT)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 422 (IMGT)	LCDR3	QQWSSNPFT
SEQ ID NO: 427	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYM

		NWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSG SGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQIT
SEQ ID NO: 428 (комбинированная)	HCDR1	GYTFTRYTMH
SEQ ID NO: 429 (комбинированная)	HCDR2	YINPSRGYTNYNQKVKD
SEQ ID NO: 430 (комбинированная)	HCDR3	YYDDHYSLDY
SEQ ID NO: 431 (Kabat)	HCDR1	RYTMH
SEQ ID NO: 429 (Kabat)	HCDR2	YINPSRGYTNYNQKVKD
SEQ ID NO: 430 (Kabat)	HCDR3	YYDDHYSLDY
SEQ ID NO: 432 (Chothia)	HCDR1	GYTFTRY
SEQ ID NO: 433 (Chothia)	HCDR2	NPSRGY
SEQ ID NO: 430 (Chothia)	HCDR3	YYDDHYSLDY
SEQ ID NO: 434 (IMGT)	HCDR1	GYTFTRYT
SEQ ID NO: 435 (IMGT)	HCDR2	INPSRGYT
SEQ ID NO: 436 (IMGT)	HCDR3	ARYYDDHYSLDY
SEQ ID NO: 437	VH	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTR YTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSS
Антитело к CD3 (2)		
SEQ ID NO: 438 (комбинированная)	LCDR1	GSSTGAVTSGNYPN
SEQ ID NO: 439 (комбинированная)	LCDR2	GTKFLAP
SEQ ID NO: 440	LCDR3	VLWYSNRWV

(комбинированная)		
SEQ ID NO: 438 (Kabat)	LCDR1	GSSTGAVTSGNYPN
SEQ ID NO: 439 (Kabat)	LCDR2	GTKFLAP
SEQ ID NO: 440 (Kabat)	LCDR3	VLWYSNRWV
SEQ ID NO: 441 (Chothia)	LCDR1	STGAVTSGNY
SEQ ID NO: 442 (Chothia)	LCDR2	GTK
SEQ ID NO: 443 (Chothia)	LCDR3	WYSNRW
SEQ ID NO: 444 (IMGT)	LCDR1	TGAVTSGNY
SEQ ID NO: 442 (IMGT)	LCDR2	GTK
SEQ ID NO: 440 (IMGT)	LCDR3	VLWYSNRWV
SEQ ID NO: 445	VL	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 446	VL	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGCGTKLTVL
SEQ ID NO: 447 (комбинированная)	HCDR1	GFTFNKYAMN
SEQ ID NO: 448 (комбинированная)	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 449 (комбинированная)	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY
SEQ ID NO: 450 (Kabat)	HCDR1	KYAMN
SEQ ID NO: 448 (Kabat)	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 449 (Kabat)	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY
SEQ ID NO: 451	HCDR1	GFTFNKY

(Chothia)		
SEQ ID NO: 452 (Chothia)	HCDR2	RSKYNNYA
SEQ ID NO: 449 (Chothia)	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY
SEQ ID NO: 453 (IMGT)	HCDR1	GFTFNKYA
SEQ ID NO: 454 (IMGT)	HCDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO: 455 (IMGT)	HCDR3	VRHGNFGNSYISYWAY
SEQ ID NO: 456	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLV TVSS
SEQ ID NO: 457	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK YAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLV TVSS
Антитело к CD3 (3)		
SEQ ID NO: 458 (комбинированная)	LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO: 459 (комбинированная)	LCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO: 460 (комбинированная)	LCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO: 458 (Kabat)	LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO: 459 (Kabat)	LCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO: 460 (Kabat)	LCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO: 461 (Chothia)	LCDR1	STGAVTTSNY
SEQ ID NO: 462	LCDR2	GTN

(Chothia)		
SEQ ID NO: 463 (Chothia)	LCDR3	WYSNLW
SEQ ID NO: 464 (IMGT)	LCDR1	TGAVTTSNY
SEQ ID NO: 465 (IMGT)	LCDR2	GGT
SEQ ID NO: 466 (IMGT)	LCDR3	ALWYSNL
SEQ ID NO: 467	VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPA RFSGSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 468	VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPA RFSGSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALW YSNLWVFGCGTKLTVL
SEQ ID NO: 469 (комбинированная)	HCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO: 448 (комбинированная)	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 470 (комбинированная)	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 471 (Kabat)	HCDR1	TYAMN
SEQ ID NO: 448 (Kabat)	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 470 (Kabat)	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 472 (Chothia)	HCDR1	GFTFNTY
SEQ ID NO: 452 (Chothia)	HCDR2	RSKYNNYA
SEQ ID NO: 470 (Chothia)	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 473 (IMGT)	HCDR1	GFTFNTYA

SEQ ID NO: 454 (IMGT)	HCDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO: 474 (IMGT)	HCDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 475	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNT YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO: 476	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNT YAMNWVRQASGKCLEWVGRIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
Антитело к CD3 (4)		
SEQ ID NO: 477 (комбинированная)	LCDR1	RSSQSLVRSEGTTYFN
SEQ ID NO: 478 (комбинированная)	LCDR2	RVSNRFS
SEQ ID NO: 479 (комбинированная)	LCDR3	LQSSHFPWT
SEQ ID NO: 477 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVRSEGTTYFN
SEQ ID NO: 478 (Kabat)	LCDR2	RVSNRFS
SEQ ID NO: 479 (Kabat)	LCDR3	LQSSHFPWT
SEQ ID NO: 480 (Chothia)	LCDR1	SQSLVRSEGTTY
SEQ ID NO: 481 (Chothia)	LCDR2	RVS
SEQ ID NO: 482 (Chothia)	LCDR3	SSHFPW
SEQ ID NO: 483 (IMGT)	LCDR1	QSLVRSEGTTY
SEQ ID NO: 481 (IMGT)	LCDR2	RVS

SEQ ID NO: 479 (IMGT)	LCDR3	LQSSHFPWT
SEQ ID NO: 484	VL	DILVTQTPVSLPVSLGGHVSISCRSSQSLVRSE GTTYFNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCLQSS HFPWTFGGGTKLELK
SEQ ID NO: 485 (комбинированная)	HCDR1	GFTFSKQGMH
SEQ ID NO: 486 (комбинированная)	HCDR2	MIYYDSSKMYYADTVKG
SEQ ID NO: 487 (комбинированная)	HCDR3	FWWDLDFDH
SEQ ID NO: 488 (Kabat)	HCDR1	KQGMH
SEQ ID NO: 486 (Kabat)	HCDR2	MIYYDSSKMYYADTVKG
SEQ ID NO: 487 (Kabat)	HCDR3	FWWDLDFDH
SEQ ID NO: 489 (Chothia)	HCDR1	GFTFSKQ
SEQ ID NO: 490 (Chothia)	HCDR2	YYDSSK
SEQ ID NO: 487 (Chothia)	HCDR3	FWWDLDFDH
SEQ ID NO: 491 (IMGT)	HCDR1	GFTFSKQG
SEQ ID NO: 492 (IMGT)	HCDR2	IYYDSSKM
SEQ ID NO: 493 (IMGT)	HCDR3	ASFWWDLDFDH
SEQ ID NO: 494	VH	EVKLVESGGDLVQPGDSLTLSCVASGFTFSKQ GMHWIRQAPKKGLEWIAMIYYDSSKMYYAD TVKGRFTISRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAM YYCASFWWDLDFDHWGQGVMVTVSS
Антитело к TCR		
SEQ ID NO: 495 (комбинированная)	LCDR1	SATSSVSYMH

SEQ ID NO: 421 (комбинированная)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 496 (комбинированная)	LCDR3	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 495 (Kabat)	LCDR1	SATSSVSYMH
SEQ ID NO: 421 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 496 (Kabat)	LCDR3	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 497 (Chothia)	LCDR1	TSSVSY
SEQ ID NO: 424 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 498 (Chothia)	LCDR3	WSSNPL
SEQ ID NO: 426 (IMGT)	LCDR1	SSVSY
SEQ ID NO: 424 (IMGT)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 496 (IMGT)	LCDR3	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 499	VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSATSSVSYM HWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPL TFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 500 (комбинированная)	HCDR1	GYKFTSYVMH
SEQ ID NO: 501 (комбинированная)	HCDR2	YINPYNDVTKYNEKFKG
SEQ ID NO: 502 (комбинированная)	HCDR3	GSYYDYDGFVY
SEQ ID NO: 503 (Kabat)	HCDR1	SYVMH
SEQ ID NO: 501 (Kabat)	HCDR2	YINPYNDVTKYNEKFKG
SEQ ID NO: 502 (Kabat)	HCDR3	GSYYDYDGFVY
SEQ ID NO: 504 (Chothia)	HCDR1	GYKFTSY

SEQ ID NO: 505 (Chothia)	HCDR2	NPYNDV
SEQ ID NO: 502 (Chothia)	HCDR3	GSYYDYDGFVY
SEQ ID NO: 506 (IMGT)	HCDR1	GYKFTSYV
SEQ ID NO: 507 (IMGT)	HCDR2	INPYNDVT
SEQ ID NO: 508 (IMGT)	HCDR3	ARGSYYDYDGFVY
SEQ ID NO: 509	VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTS YVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYN EKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAV HYCARGSYYDYDGFVYWGQGTLVTVSA
Антитело к CD28 (1)		
SEQ ID NO: 510 (комбинированная)	LCDR1	HASQNIYVWLN
SEQ ID NO: 511 (комбинированная)	LCDR2	KASNLHT
SEQ ID NO: 512 (комбинированная)	LCDR3	QQGQTYPYT
SEQ ID NO: 510 (Kabat)	LCDR1	HASQNIYVWLN
SEQ ID NO: 511 (Kabat)	LCDR2	KASNLHT
SEQ ID NO: 512 (Kabat)	LCDR3	QQGQTYPYT
SEQ ID NO: 513 (Chothia)	LCDR1	SQNIYVW
SEQ ID NO: 514 (Chothia)	LCDR2	KAS
SEQ ID NO: 515 (Chothia)	LCDR3	GQTYPY
SEQ ID NO: 516 (IMGT)	LCDR1	QNIYVW
SEQ ID NO: 514 (IMGT)	LCDR2	KAS

SEQ ID NO: 512 (IMGT)	LCDR3	QQGQTYPYT
SEQ ID NO: 517	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVW LNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYP YTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 518	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVW LNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYP YTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 519 (комбинированная)	HCDR1	GYTFTSYYIH
SEQ ID NO: 520 (комбинированная)	HCDR2	CIYPGNVNTNYNEKFKD
SEQ ID NO: 521 (комбинированная)	HCDR3	SHYGLDWNFDV
SEQ ID NO: 522 (Kabat)	HCDR1	SYYIH
SEQ ID NO: 520 (Kabat)	HCDR2	CIYPGNVNTNYNEKFKD
SEQ ID NO: 521 (Kabat)	HCDR3	SHYGLDWNFDV
SEQ ID NO: 523 (Chothia)	HCDR1	GYTFTSY
SEQ ID NO: 524 (Chothia)	HCDR2	YPGNVN
SEQ ID NO: 521 (Chothia)	HCDR3	SHYGLDWNFDV
SEQ ID NO: 525 (IMGT)	HCDR1	GYTFTSYY
SEQ ID NO: 526 (IMGT)	HCDR2	IYPGNVNT
SEQ ID NO: 527 (IMGT)	HCDR3	TRSHYGLDWNFDV

SEQ ID NO: 528	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNE KFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVY FCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 529	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNE KFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVY FCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSC
Антитело к CD28 (2)		
SEQ ID NO: 530 (комбинированная)	LCDR1	SGSSSNIVSNYVN
SEQ ID NO: 531 (комбинированная)	LCDR2	DNNKRPS
SEQ ID NO: 532 (комбинированная)	LCDR3	QSYAIGSYSVV
SEQ ID NO: 530 (Kabat)	LCDR1	SGSSSNIVSNYVN
SEQ ID NO: 531 (Kabat)	LCDR2	DNNKRPS
SEQ ID NO: 532 (Kabat)	LCDR3	QSYAIGSYSVV
SEQ ID NO: 533 (Chothia)	LCDR1	SSSNIVSNY
SEQ ID NO: 534 (Chothia)	LCDR2	DNN
SEQ ID NO: 535 (Chothia)	LCDR3	YAIGSYSV
SEQ ID NO: 536 (IMGT)	LCDR1	SSNIVSNY
SEQ ID NO: 534 (IMGT)	LCDR2	DNN
SEQ ID NO: 532 (IMGT)	LCDR3	QSYAIGSYSVV

SEQ ID NO: 537	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIVSNY VNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYAIGS YSVVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 538 (комбинированная)	HCDR1	GFTFSTYGMS
SEQ ID NO: 539 (комбинированная)	HCDR2	SIFYTGSSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 540 (комбинированная)	HCDR3	IGYAGDSKYAI
SEQ ID NO: 541 (Kabat)	HCDR1	TYGMS
SEQ ID NO: 539 (Kabat)	HCDR2	SIFYTGSSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 540 (Kabat)	HCDR3	IGYAGDSKYAI
SEQ ID NO: 542 (Chothia)	HCDR1	GFTFSTY
SEQ ID NO: 543 (Chothia)	HCDR2	FYTGSS
SEQ ID NO: 540 (Chothia)	HCDR3	IGYAGDSKYAI
SEQ ID NO: 544 (IMGT)	HCDR1	GFTFSTYG
SEQ ID NO: 545 (IMGT)	HCDR2	IFYTGSST
SEQ ID NO: 546 (IMGT)	HCDR3	ARIGYAGDSKYAI
SEQ ID NO: 547	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY GMSWVRQAPGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARIGYAGDSKYAIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 548	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY GMSWVRQAPGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARIGYAGDSKYAIWGQGTLVTVSS
Антитело к ICOS		

SEQ ID NO: 549 (комбинированная)	LCDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
SEQ ID NO: 550 (комбинированная)	LCDR2	YASTRHT
SEQ ID NO: 551 (комбинированная)	LCDR3	HHHYNAPPT
SEQ ID NO: 549 (Kabat)	LCDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
SEQ ID NO: 550 (Kabat)	LCDR2	YASTRHT
SEQ ID NO: 551 (Kabat)	LCDR3	HHHYNAPPT
SEQ ID NO: 552 (Chothia)	LCDR1	SQSLLSGSFNY
SEQ ID NO: 553 (Chothia)	LCDR2	YAS
SEQ ID NO: 554 (Chothia)	LCDR3	HYNAPP
SEQ ID NO: 555 (IMGT)	LCDR1	QSLLSGSFNY
SEQ ID NO: 553 (IMGT)	LCDR2	YAS
SEQ ID NO: 551 (IMGT)	LCDR3	HHHYNAPPT
SEQ ID NO: 556	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSGS FNYLTWYQQKPGQPPKLLIFYASTRHTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHHHY NAPPTFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 557	LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSGS FNYLTWYQQKPGQPPKLLIFYASTRHTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHHHY NAPPTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 558 (комбинированная)	HCDR1	GFTFSDYWMD

SEQ ID NO: 559 (комбинированная)	HCDR2	NIDEDGSITEYSPFVKG
SEQ ID NO: 560 (комбинированная)	HCDR3	WGRFGFDS
SEQ ID NO: 561 (Kabat)	HCDR1	DYWMD
SEQ ID NO: 559 (Kabat)	HCDR2	NIDEDGSITEYSPFVKG
SEQ ID NO: 560 (Kabat)	HCDR3	WGRFGFDS
SEQ ID NO: 562 (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO: 563 (Chothia)	HCDR2	DEDGSI
SEQ ID NO: 560 (Chothia)	HCDR3	WGRFGFDS
SEQ ID NO: 564 (IMGT)	HCDR1	GFTFSDYW
SEQ ID NO: 565 (IMGT)	HCDR2	IDEDGSIT
SEQ ID NO: 566 (IMGT)	HCDR3	TRWGRFGFDS
SEQ ID NO: 567	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMDWVRQAPGKGLVWVSNIDEDGSITEYSPF VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCTRWGRFGFDSWGQGTLVTVSS
Антитело к CD27		
SEQ ID NO: 568 (комбинированная)	LCDR1	RASQGISRWLA
SEQ ID NO: 55 (комбинированная)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 569 (комбинированная)	LCDR3	QQYNTYPRT
SEQ ID NO: 568 (Kabat)	LCDR1	RASQGISRWLA
SEQ ID NO: 55 (Kabat)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 569 (Kabat)	LCDR3	QQYNTYPRT
SEQ ID NO: 570	LCDR1	SQGISRW

(Chothia)		
SEQ ID NO: 58 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 571 (Chothia)	LCDR3	YNTYPR
SEQ ID NO: 572 (IMGT)	LCDR1	QGISRW
SEQ ID NO: 58 (IMGT)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 569 (IMGT)	LCDR3	QQYNTYPRT
SEQ ID NO: 573	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWL AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRT FGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 574 (комбинированная)	HCDR1	GFTFSSYDMH
SEQ ID NO: 575 (комбинированная)	HCDR2	VIWYDGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 576 (комбинированная)	HCDR3	GSGNWGFFDY
SEQ ID NO: 577 (Kabat)	HCDR1	SYDMH
SEQ ID NO: 575 (Kabat)	HCDR2	VIWYDGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 576 (Kabat)	HCDR3	GSGNWGFFDY
SEQ ID NO: 47 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 578 (Chothia)	HCDR2	WYDGSN
SEQ ID NO: 576 (Chothia)	HCDR3	GSGNWGFFDY
SEQ ID NO: 579 (IMGT)	HCDR1	GFTFSSYD
SEQ ID NO: 580 (IMGT)	HCDR2	IWYDGSNK
SEQ ID NO: 581	HCDR3	ARGSGNWGFFDY

(IMGT)		
SEQ ID NO: 582	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY DMHWVRQAPGGLEWVAVIWYDGSNKYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGSGNWGFFDYWGQGTLVTVSS
Антитело к CD25 (1)		
SEQ ID NO: 583 (комбинированная)	LCDR1	SASSSRSYMQ
SEQ ID NO: 421 (комбинированная)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 584 (комбинированная)	LCDR3	HQRSSYT
SEQ ID NO: 583 (Kabat)	LCDR1	SASSSRSYMQ
SEQ ID NO: 421 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 584 (Kabat)	LCDR3	HQRSSYT
SEQ ID NO: 585 (Chothia)	LCDR1	SSSRSY
SEQ ID NO: 424 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 586 (Chothia)	LCDR3	RSSY
SEQ ID NO: 587 (IMGT)	LCDR1	SSRSY
SEQ ID NO: 424 (IMGT)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 584 (IMGT)	LCDR3	HQRSSYT
SEQ ID NO: 588	VL	QIVSTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSRSYM QWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTF GGGTKLEIK
SEQ ID NO: 589 (комбинированная)	HCDR1	GYSFTRYWMH
SEQ ID NO: 590	HCDR2	AIYPGNSDTSYNQKFEG

(комбинированная)		
SEQ ID NO: 591 (комбинированная)	HCDR3	DYGYYFDF
SEQ ID NO: 592 (Kabat)	HCDR1	RYWMH
SEQ ID NO: 590 (Kabat)	HCDR2	AIYPGNSDTSYNQKFEG
SEQ ID NO: 591 (Kabat)	HCDR3	DYGYYFDF
SEQ ID NO: 593 (Chothia)	HCDR1	GYSFTRY
SEQ ID NO: 594 (Chothia)	HCDR2	YPGNSD
SEQ ID NO: 591 (Chothia)	HCDR3	DYGYYFDF
SEQ ID NO: 595 (IMGT)	HCDR1	GYSFTRYW
SEQ ID NO: 596 (IMGT)	HCDR2	IYPGNSDT
SEQ ID NO: 597 (IMGT)	HCDR3	SRDYGYYFDF
SEQ ID NO: 598	VH	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTR YWMHWIKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYN QKFEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSA VYYCSRDYGYYFDFWGQGTTLTVSS
Антитело к CD25 (2)		
SEQ ID NO: 599 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 600 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 601 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 599 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 600 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 601 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 602 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYDGDSY

SEQ ID NO: 58 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 603 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 604 (IMGT)	LCDR1	QSVDYDGDSY
SEQ ID NO: 58 (IMGT)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 601 (IMGT)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 605	VL	DIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSVDYDG DSYMNWYQQRPGQSPRLLIYAASNLESGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSN EDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 606	LC	DIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSVDYDG DSYMNWYQQRPGQSPRLLIYAASNLESGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSN EDPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 607 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 608 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 609 (комбинированная)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 610 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 608 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 609 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 611 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 612 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 609	HCDR3	WRGDGYYAYFDV

(Chothia)		
SEQ ID NO: 613 (IMGT)	HCDR1	GYAFTNYL
SEQ ID NO: 614 (IMGT)	HCDR2	INPGSGGT
SEQ ID NO: 615 (IMGT)	HCDR3	ARWRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 616	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFTN YLIEWVRQMPGKGLEWMGVINPGSGGTNYN EKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARWRGDGYYAYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 617	HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFTN YLIEWVRQMPGKGLEWMGVINPGSGGTNYN EKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARWRGDGYYAYFDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSC
Антитело к 4-1BB		
SEQ ID NO: 618 (комбинированная)	LCDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID NO: 619 (комбинированная)	LCDR2	DASNRAT
SEQ ID NO: 620 (комбинированная)	LCDR3	QQRSNWPPALT
SEQ ID NO: 618 (Kabat)	LCDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID NO: 619 (Kabat)	LCDR2	DASNRAT
SEQ ID NO: 620 (Kabat)	LCDR3	QQRSNWPPALT
SEQ ID NO: 621 (Chothia)	LCDR1	SQSVSSY
SEQ ID NO: 622 (Chothia)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 623	LCDR3	RSNWPPAL

(Chothia)		
SEQ ID NO: 624 (IMGT)	LCDR1	QSVSSY
SEQ ID NO: 622 (IMGT)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 620 (IMGT)	LCDR3	QQRSNWPPALT
SEQ ID NO: 625	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPA LTFCGGTKVEIK
SEQ ID NO: 626 (комбинированная)	HCDR1	GGSFSGYYWS
SEQ ID NO: 627 (комбинированная)	HCDR2	EINHGGYVTYNPSLES
SEQ ID NO: 628 (комбинированная)	HCDR3	DYGPGNYDWYFDL
SEQ ID NO: 629 (Kabat)	HCDR1	GYYWS
SEQ ID NO: 627 (Kabat)	HCDR2	EINHGGYVTYNPSLES
SEQ ID NO: 628 (Kabat)	HCDR3	DYGPGNYDWYFDL
SEQ ID NO: 630 (Chothia)	HCDR1	GGSFSGY
SEQ ID NO: 631 (Chothia)	HCDR2	NHGGY
SEQ ID NO: 628 (Chothia)	HCDR3	DYGPGNYDWYFDL
SEQ ID NO: 632 (IMGT)	HCDR1	GGSFSGYY
SEQ ID NO: 633 (IMGT)	HCDR2	INHGGYV
SEQ ID NO: 634 (IMGT)	HCDR3	ARDYGPGNYDWYFDL
SEQ ID NO: 635	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSG YYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPS

		LESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARDYGPGNYDWYFDLWGRGTLVTVSS
Антитело к IL6RA		
SEQ ID NO: 636 (комбинированная)	LCDR1	RASQDISSYLN
SEQ ID NO: 637 (комбинированная)	LCDR2	YTSRLHS
SEQ ID NO: 300 (комбинированная)	LCDR3	QQGNTLPYT
SEQ ID NO: 636 (Kabat)	LCDR1	RASQDISSYLN
SEQ ID NO: 637 (Kabat)	LCDR2	YTSRLHS
SEQ ID NO: 300 (Kabat)	LCDR3	QQGNTLPYT
SEQ ID NO: 638 (Chothia)	LCDR1	SQDISSY
SEQ ID NO: 639 (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO: 640 (Chothia)	LCDR3	GNTLPY
SEQ ID NO: 641 (IMGT)	LCDR1	QDISSY
SEQ ID NO: 639 (IMGT)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO: 300 (IMGT)	LCDR3	QQGNTLPYT
SEQ ID NO: 642	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPYTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 643 (комбинированная)	HCDR1	GYSITSDHAWS
SEQ ID NO: 644 (комбинированная)	HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS
SEQ ID NO: 645 (комбинированная)	HCDR3	SLARTTAMDY

SEQ ID NO: 646 (Kabat)	HCDR1	SDHAWS
SEQ ID NO: 644 (Kabat)	HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS
SEQ ID NO: 645 (Kabat)	HCDR3	SLARTTAMDY
SEQ ID NO: 647 (Chothia)	HCDR1	GYSITSDH
SEQ ID NO: 648 (Chothia)	HCDR2	SYSGI
SEQ ID NO: 645 (Chothia)	HCDR3	SLARTTAMDY
SEQ ID NO: 649 (IMGT)	HCDR1	GYSITSDHA
SEQ ID NO: 650 (IMGT)	HCDR2	ISYSGIT
SEQ ID NO: 651 (IMGT)	HCDR3	ARSLARTTAMDY
SEQ ID NO: 652	VH	QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGYSITSD HAWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNPSL KSRVTMLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYY CARSLARTTAMDYWGQGSLVTVSS
Антитело к IL6RB		
SEQ ID NO: 54 (комбинированная)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55 (комбинированная)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 653 (комбинированная)	LCDR3	QQSYSTPPIT
SEQ ID NO: 54 (Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55 (Kabat)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 653 (Kabat)	LCDR3	QQSYSTPPIT
SEQ ID NO: 57 (Chothia)	LCDR1	SQSISSY
SEQ ID NO: 58 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 654	LCDR3	SYSTPPI

(Chothia)		
SEQ ID NO: 60 (IMGT)	LCDR1	QSISSY
SEQ ID NO: 58 (IMGT)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 653 (IMGT)	LCDR3	QQSYSTPPIT
SEQ ID NO: 655	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITF GQGTRLEIK
SEQ ID NO: 656 (комбинированная)	HCDR1	GFTFSDYYMT
SEQ ID NO: 657 (комбинированная)	HCDR2	YISSSGTNKYNADSVKG
SEQ ID NO: 658 (комбинированная)	HCDR3	DPPWGMDV
SEQ ID NO: 659 (Kabat)	HCDR1	DYYMT
SEQ ID NO: 657 (Kabat)	HCDR2	YISSSGTNKYNADSVKG
SEQ ID NO: 658 (Kabat)	HCDR3	DPPWGMDV
SEQ ID NO: 562 (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO: 660 (Chothia)	HCDR2	SSSGTN
SEQ ID NO: 658 (Chothia)	HCDR3	DPPWGMDV
SEQ ID NO: 661 (IMGT)	HCDR1	GFTFSDYY
SEQ ID NO: 662 (IMGT)	HCDR2	ISSSGTNK
SEQ ID NO: 663 (IMGT)	HCDR3	VRDPPWGMDV
SEQ ID NO: 664	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YYMTWIRQTPGKGLDWVSYISSSGTNKYNAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCVRDPPWGMDVWGQGTTVTVSS

Антитело к CD2 (1)		
SEQ ID NO: 665 (комбинированная)	LCDR1	RSSQSLLHSSGNTYLN
SEQ ID NO: 666 (комбинированная)	LCDR2	LVSKLES
SEQ ID NO: 667 (комбинированная)	LCDR3	MQFTHYPYT
SEQ ID NO: 665 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLLHSSGNTYLN
SEQ ID NO: 666 (Kabat)	LCDR2	LVSKLES
SEQ ID NO: 667 (Kabat)	LCDR3	MQFTHYPYT
SEQ ID NO: 668 (Chothia)	LCDR1	SQSLLHSSGNTY
SEQ ID NO: 669 (Chothia)	LCDR2	LVS
SEQ ID NO: 670 (Chothia)	LCDR3	FTHYPY
SEQ ID NO: 671 (IMGT)	LCDR1	QSLLHSSGNTY
SEQ ID NO: 669 (IMGT)	LCDR2	LVS
SEQ ID NO: 667 (IMGT)	LCDR3	MQFTHYPYT
SEQ ID NO: 672	VL	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSS GNTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPD RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQFT HYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 673	LC	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSS GNTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPD RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQFT HYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 674	HCDR1	GYIFTEYYMY

(комбинированная)		
SEQ ID NO: 675 (комбинированная)	HCDR2	RIDPEDGSIDYVEKFKK
SEQ ID NO: 676 (комбинированная)	HCDR3	GKFNYRFAY
SEQ ID NO: 677 (Kabat)	HCDR1	EYYMY
SEQ ID NO: 675 (Kabat)	HCDR2	RIDPEDGSIDYVEKFKK
SEQ ID NO: 676 (Kabat)	HCDR3	GKFNYRFAY
SEQ ID NO: 678 (Chothia)	HCDR1	GYIFTEY
SEQ ID NO: 679 (Chothia)	HCDR2	DPEDGS
SEQ ID NO: 676 (Chothia)	HCDR3	GKFNYRFAY
SEQ ID NO: 680 (IMGT)	HCDR1	GYIFTEYY
SEQ ID NO: 681 (IMGT)	HCDR2	IDPEDGSI
SEQ ID NO: 682 (IMGT)	HCDR3	ARGKFNYRFAY
SEQ ID NO: 683	VH	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTE YYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVE KFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAV YYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 684	HC	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTE YYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVE KFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAV YYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SC

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержатся в полиспецифической связывающей молекуле. Таким образом,

в данном документе рассматриваются полиспецифические связывающие молекулы, содержащие средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, такие как, без ограничения, полиспецифическая связывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий домен для CD3 и один или несколько из антигенсвязывающих доменов для CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RA, IL6RB и/или CD2. Неограничивающие примеры таких связывающих доменов, как указано выше, представлены выше, например, в **таблице 27** и в публикациях, включенных в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит антигенсвязывающий домен для CD3 и антигенсвязывающий домен для CD28 или CD2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD3 представляет собой антитело к CD3, необязательно антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к CD3 (3) или антитело к CD3 (4), представленное в **таблице 27**, или фрагмент антитела, содержащие одну или несколько их CDR, VH и/или VL. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD28 представляет собой антитело к CD28, необязательно антитело к CD28 (1) или антитело к CD28 (2), представленное в **таблице 27**, или фрагмент антитела, содержащие одну или несколько их CDR, VH, тяжелых цепей, VL и/или легких цепей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD2 представляет собой антитело к CD2, необязательно антитело к CD2 (1), представленное в **таблице 27**, или фрагмент антитела, содержащие одну или несколько их CDR, VH, тяжелых цепей, VL и/или легких цепей.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические связывающие молекулы содержат одну или несколько тяжелых и/или легких цепей. Неограничивающие иллюстративные последовательности тяжелых и легких цепей, которые могут содержаться в этих полиспецифических связывающих молекулах, представлены в **таблице 28** ниже. Неограничивающие иллюстративные их комбинации предложены в **таблице 28** на основании отнесения перечисленных тяжелых и/или легких цепей к составляющим конструкции. В данной организации в виде конструкции представлены примеры конфигураций тяжелых и/или легких цепей, но также возможны их дополнительные комбинации и перестановки.

Таблица 28 - Иллюстративные последовательности тяжелых цепей (HC) и легких цепей (LC)

SEQ ID NO:	Цепь	Аминокислотная последовательность
701	Fc дикого типа	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
702	Fc DANAPA	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
673	LC NEG2042	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

703	HC NEG2042	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYW VRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTAD TSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGG VVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLE WIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQM DSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQW SSNPFTFGQGTKLQIT
518	LC NEG2043	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

704	HC NEG2043	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHW VRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTV DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG KGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTA FLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTP VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIY DTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC QQWSSNPFTFGQGTKLQIT
705	LC NEG2044	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIVSNYVNWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI TGLQSEDEADYYCQSYAIGSYSVVFGGGTKLTVLGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

706	HC NEG2044	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSW VRQAPGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIGYAGDSKYAI WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG KGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTA FLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTP VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIY DTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC QQWSSNPFTFGQGTKLQIT
673	LC NEG2050	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

707	HC NEG2050	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYW VRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTAD TSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKCLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGCGTKLTVL
673	LC NEG2051	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

708	HC NEG2051	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYW VRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTAD TSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKCLE WVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLSGAQPEDEA EYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL
518	LC NEG2052	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

709	HC NEG2052	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHW VRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTV DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGCGTKLTVL
518	LC NEG2053	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

710	HC NEG2053	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHW VRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTV DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASG KCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKS TLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLSGAQPE DEAEYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL
673	Легкая цепь конструкции 1	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

711	Тяжелая цепь конструкции 1	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKAS GYIFTEYYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVE KFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCAR GKFNYRFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
518	Легкая цепь конструкции 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

712	Тяжелая цепь конструкции 2	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYN EKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTR SHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
673	Легкая цепь конструкции 3	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

713	Тяжелая цепь конструкции 3	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYW VRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTAD TSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGG VVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLE WIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQM DSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQW SSNPFTFGQGTKLQIT
518	Легкая цепь конструкции 4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

714	Тяжелая цепь конструкции 4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHW VRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTV DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQS GGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG KGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTA FLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTP VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIY DTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC QQWSSNPFTFGQGTKLQIT
673	Легкая цепь конструкции 5	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

715	Тяжелая цепь конструкции 5	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYW VRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTAD TSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC GGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASG YTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQ KVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARY YDDHYSLDYWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMN WYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
518	Легкая цепь конструкции 6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

716	Тяжелая цепь конструкции 6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHW VRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTV DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCK ASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTN YNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFC ARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVS YMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGS GTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQ ITGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
673	Легкая цепь конструкции 7	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

717	Тяжелая цепь конструкции 7	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVQRP GASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVRQAPGQGLELVGR IDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTS DDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
518	Легкая цепь конструкции 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

718	Тяжелая цепь конструкции 8	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGCI YPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRS DDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
673	Легкая цепь конструкции 9	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

719	Тяжелая цепь 1 конструкции 9	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYW VRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTAD TSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK
720	Тяжелая цепь 2 конструкции 9	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
518	Легкая цепь конструкции 10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

721	Тяжелая цепь 1 конструкции 10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHW VRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTV DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
720	Тяжелая цепь 2 конструкции 10	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
722	Тяжелая цепь 1 конструкции 11	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK

720	Тяжелая цепь 2 конструкции 11	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
673	Легкая цепь конструкции 12	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
719	Тяжелая цепь 1 конструкции 12	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYW VRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTAD TSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK

723	Тяжелая цепь 2 конструкции 12	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGCEMЯPCACESLVKFQAKVE GLLQALTRKLEAVSKRLAILENTVV
518	Легкая цепь конструкции 13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
721	Тяжелая цепь 1 конструкции 13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHW VRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTV DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK

723	Тяжелая цепь 2 конструкции 13	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGCEMЯPCACESLVKFQAKVE GLLQALTRKLEAVSKRLAILENTVV
722	Тяжелая цепь 1 конструкции 14	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK

723	Тяжелая цепь 2 конструкции 14	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGCEMЯPCACESLVKFQAKVE GLLQALTRKLEAVSKRLAILENTVV
673	Легкая цепь конструкции 15	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYL NWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDF TLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
719	Тяжелая цепь 1 конструкции 15	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYW VRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTAD TSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK

724	Тяжелая цепь 2 конструкции 15	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSDLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQV REITFLKNTVMECDACGMQQ
518	Легкая цепь конструкции 16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQ QKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
721	Тяжелая цепь 1 конструкции 16	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHW VRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTV DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK

724	Тяжелая цепь 2 конструкции 16	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSDLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQV REITFLKNTVMECDACGMQQ
722	Тяжелая цепь 1 конструкции 17	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK

724	Тяжелая цепь 2 конструкции 17	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTIS RDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLD YWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSDLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQV REITFLKNTVMECDACGMQQ

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело имеет конфигурацию согласно любой из схем, представленных на **фиг. 50A, фиг. 51A-51B,** а также **фиг. 61A-61B** и **фиг. 63A-63B**. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело является одновалентным или двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область биспецифического антитела подвергнута сайленсингу.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит множество биспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител являются одновалентными. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител содержат Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область одного или нескольких из множества биспецифических антител подвергнута сайленсингу. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител конъюгированы друг с другом в виде мультимера. В некоторых вариантах осуществления мультимер имеет конфигурацию согласно любой из схем, представленных на **фиг. 50B** и **фиг. 51B**.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит Fc-область, например, где Fc-область характеризуется сайленсингом Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутацию в одном или нескольких (например, всех) из D265, N297 и P329. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации D265A, N297A и

P329A (DANAPA).

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит первый связывающий домен и второй связывающий домен. Например, первый связывающий домен может представлять собой домен, связывающий CD3, а второй связывающий домен может представлять собой домен, связывающий костимулирующую молекулу, или первый связывающий домен может представлять собой домен, связывающий костимулирующую молекулу, а второй связывающий домен может представлять собой домен, связывающий CD3. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, связывается с CD2, CD28, CD25, CD27, IL6Rb, ICOS или 41BB. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, активирует CD2, CD28, CD25, CD27, IL6Rb, ICOS или 41BB. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит Fc-область, подвергнутую мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область, содержащую мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA).

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например, scFv) расположен с N-концевой стороны от VH второго связывающего домена (например, Fab-фрагмента), например, связанного посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит одну или несколько (например, все) из CH1, CH2 и CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)4), VL первого связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S)4), VH второго связывающего домена, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL второго связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит Fc-область, подвергнутую мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область, содержащую мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA). В некоторых вариантах осуществления первый связывающий фрагмент содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2, например, Fab для CD2, например, содержащий последовательность антитела к CD2, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28,

например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD28, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий фрагмент содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 или CD28, например, scFv для CD2 или CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD2 или CD28, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, Fab для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 27. Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде верхней левой конструкции на **фиг. 50A**; конструкции 1 или конструкции 2 на **фиг. 51A** и конструкции 1 или конструкции 2 в таблице 28.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например, Fab-фрагмент) расположен с N-концевой стороны от второго связывающего домена (например, scFv), например, где между первым и вторым связывающими доменами расположена Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область подвергнута мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область содержит мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит одну или несколько (например, все) из CH1, CH2 и CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, CH1, CH2, CH3, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)4), VH второго связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S)4) и VL второго связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL первого связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2, например, Fab для CD2, например, содержащий последовательность антитела к CD2, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD28, раскрытую в таблице 27, например, антитело к CD28 (1) или антитело к CD28 (2). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 27, например, антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к CD3 (3) или антитело к CD3 (4). В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, Fab для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 27, например, антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к

CD3 (3) или антитело к CD3 (4). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 или CD28, например, scFv для CD2 или CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD2 или CD28, раскрытую в таблице 27. Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде второй слева конструкции в верхнем ряду на **фиг. 50A**; конструкции 3 или конструкции 4 на **фиг. 51A** и конструкции 3 или конструкции 4 в таблице 28.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например, Fab-фрагмент) расположен с N-концевой стороны от второго связывающего домена (например, scFv), например, посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит одну или несколько (например, все) из CH1, CH2 и CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, CH1, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)2), VH второго связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S)4), VL второго связывающего домена, третий пептидный линкер (например, линкер (G4S)4), CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL первого связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит Fc-область, подвергнутую мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область, содержащую мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA). В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2, например, Fab для CD2, например, содержащий последовательность антитела к CD2, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD28, раскрытую в таблице 27, например, антитело к CD28 (1) или антитело к CD28 (2). В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD25 (например, Fab для CD25), домен, связывающий CD27 (например, Fab для CD27), домен, связывающий IL6Rb (например, Fab для IL6Rb), домен, связывающий ICOS (например, Fab для ICOS), или домен, связывающий 41BB (например, Fab для 41BB). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 27, например, антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к CD3 (3) или антитело к CD3 (4). В некоторых вариантах осуществления первый

связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, Fab для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 27, например, антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к CD3 (3) или антитело к CD3 (4). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 (например, scFv для CD2), домен, связывающий CD28 (например, scFv для CD28), домен, связывающий CD25 (например, scFv для CD25), домен, связывающий CD27 (например, scFv для CD27), домен, связывающий IL6Rb (например, scFv для IL6Rb), домен, связывающий ICOS (например, scFv для ICOS), или домен, связывающий 41BB (например, scFv для 41BB). Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде третьей слева конструкции в верхнем ряду на **фиг. 50A**; конструкции 5 или конструкции 6 на **фиг. 51A** и конструкции 5 или конструкции 6 в таблице 28.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например, scFv) расположен с N-концевой стороны от второго связывающего домена (например, Fab-фрагмента), например, где между первым и вторым связывающими доменами расположена Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область подвергнута мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область содержит мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит одну или несколько (например, все) из CH2, CH3 и CH1, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)4), VL первого связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S)), CH2, CH3, третий пептидный линкер (например, линкер (G4S)4), VH второго связывающего домена и CH1. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL второго связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2, например, Fab для CD2, например, содержащий последовательность антитела к CD2, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD28, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 или CD28, например,

scFv для CD2 или CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD2 или CD28, раскрытую в таблице 27. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, Fab для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 27. Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде крайней справа конструкции в верхнем ряду на **фиг. 50A**; конструкции 7 или конструкции 8 на **фиг. 51A** и конструкции 7 или конструкции 8 в таблице 28.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например, Fab-фрагмент) расположен с N-концевой стороны от первой Fc-области. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит одну или несколько (например, все) из первой CH1, первой CH2 и первой CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен (например, scFv) расположен с N-концевой стороны от второй Fc-области, например, во второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит, например, во второй полипептидной цепи, одну или несколько (например, обе) из второй CH2 и второй CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит гетеродимерную молекулу антитела, как, например, где первая и вторая Fc-области содержат мутации типа "выступ во впадину". В некоторых вариантах осуществления первая Fc-область связана со второй Fc-областью сильнее, чем первая Fc-область связана с другой копией первой Fc-области. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, первую CH1, первую CH2 и первую CH3. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH второго связывающего домена, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)), VL второго связывающего домена, вторую CH2 и вторую CH3. В некоторых вариантах осуществления третий полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL первого связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид полиспецифической связывающей молекулы дополнительно содержит гомомультимеризационный домен, например, белок матрилин 1 или суперспиральный домен олигомерного матриксного белка хряща (COMPcc), расположенный с C-концевой стороны от второй CH3, например, посредством пептидного линкера (например, линкера (G4S)4, линкера (G4S) или линкера (G4S)3). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит две, три, четыре или пять копий первого связывающего домена и такое же количество копий второго связывающего домена, например, как изображено на **фиг. 50B**. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 (например, Fab для

CD2). В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28 (например, Fab для CD28). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3. Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде крайней слева конструкции в нижнем ряду на **фиг. 50A**; конструкций на **фиг. 50B**, конструкции 9, конструкции 10, конструкции 12, конструкции 13, конструкции 15 и конструкции 16 на **фиг. 51B** и конструкции 9, конструкции 10, конструкции 12, конструкции 13, конструкции 15 и конструкции 16 в таблице 28.

В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен (например, scFv) расположен с N-концевой стороны от Fc-области. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит гетеродимерную молекулу антитела, как, например, где первая и вторая Fc-области содержат мутации типа "выступ во впадину". В некоторых вариантах осуществления первая Fc-область связана со второй Fc-областью сильнее, чем первая Fc-область связана с другой копией первой Fc-области. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит одну или несколько (например, все) из CH2 и CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH связывающего домена, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)4), VL связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 или линкер (G4S)), CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид связывающей молекулы дополнительно содержит гомомультимеризационный домен, например, белок матрилин 1 или суперспиральный домен олигомерного матриксного белка хряща (COMPcc), расположенный с C-концевой стороны от второй CH3, например, посредством пептидного линкера (например, линкера (G4S)4, линкера (GS4)3 или линкера (G4S)). В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит две, три, четыре или пять копий связывающего домена, например, как изображено на **фиг. 50B**. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, отсутствует. Примеры таких связывающих молекул изображены в виде крайней справа конструкции в нижнем ряду на **фиг. 50A**; конструкции 11, конструкции 14 и конструкции 17 на **фиг. 51B** и конструкции 11, конструкции 14 и конструкции 17 в таблице 28.

Понятно, что во многих вариантах осуществления в данном документе полиспецифическая связывающая молекула содержит две или более полипептидные цепи, которые ковалентно связаны друг с другом, например, посредством дисульфидного мостика. Однако в некоторых вариантах осуществления две или более полипептидные цепи полиспецифической связывающей молекулы могут быть нековалентно связаны друг

с другом.

Также понятно, что Fab-фрагмент может присутствовать в качестве части более крупного белка, например, Fab-фрагмент может быть слит с CH2 и CH3 и, таким образом, являться частью полноразмерного антитела.

Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, раскрытые в данном документе, предполагается для применения в вариантах осуществления изготовления, раскрытых в данном документе, например, в традиционном изготовлении или быстром изготовлении с активацией.

Варианты Fc

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит Fc-область, например, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область дикого типа, например, Fc-область человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает в себя вариант, например, Fc-область, содержащую добавление, замену или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в Fc-области, которые приводят к, например, снижению или устранению аффинности к по меньшей мере одному Fc-рецептору.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела взаимодействует с рядом рецепторов или лигандов, в том числе Fc-рецепторами (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA), белком CIq системы комплемента и другими молекулами, такими как белки A и G. Эти взаимодействия способствуют различным эффекторным функциям и событиям нисходящей передачи сигнала, в том числе антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), антителозависимому клеточному фагоцитозу (ADCP) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержащая вариант Fc-области, характеризуется сниженной, например, устраненной, аффинностью к Fc-рецептору, например, Fc-рецептору, описанному в данном документе. В некоторых вариантах осуществления аффинность снижена по сравнению с в остальном сходным антителом с Fc-областью дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержащая вариант Fc-области, обладает одним или несколькими из следующих свойств: (1) сниженной эффекторной функцией (например, сниженными ADCC, ADCP и/или CDC); (2) сниженным связыванием с одним или несколькими Fc-рецепторами и/или (3) сниженным связыванием с компонентом C1q системы комплемента. В некоторых вариантах осуществления снижение любого или всех из свойств (1)-(3) имеет место по сравнению с в остальном сходным антителом с Fc-областью дикого типа.

Иллюстративные варианты Fc-области представлены в **таблице 34** и также раскрыты в Saunders O, (2019) Frontiers in Immunology; том 10, статья 1296, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит любые или все из вариантов Fc-области, например, мутаций, раскрытых в **таблице 34**, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит любые или все из мутантного варианта, содержащего L234, например, L234A, и/или L235, например, мутацию L234A (LALA), в аминокислотной последовательности Fc IgG1; D265, например, D265A, и/или P329, например, P329A (DAPA); N297, например, N297A; DANAPA (D265A, N297A и P329A); и/или L234, например, L234A, L235, например, L235A, D265, например, D265A, N297, например, N297A, и P331, например, P331S (LALADANAPS), или любую их комбинацию.

Таблица 34. Иллюстративные модификации Fc

Модификация или мутация	**Измененная эффекторная функция**
Leu235Glu	ADCC;
Leu234Ala/Leu235Ala (LALA)	ADCC; ADCP; CDC
Ser228Pro/Leu235Glu	
Leu234Ala/Leu235Ala/Pro329Gly	ADCP
Pro331Ser/Leu234Glu/Leu235Phe	CDC
Asp265Ala	ADCC, ADCP
Gly237Ala	ADCP
Glu318Ala	ADCP
Glu233Pro	
Gly236Arg/Leu328Arg	ADCC
His268Gln/Val309Leu/Ala330Ser/Pro331Ser	ADCC; ADCP; CDC
Val234Ala/Gly237Ala/Pro238Ser/His268Ala/Val309Leu/Ala330Ser/Pro331Ser	ADCC; ADCP; CDC
Leu234Ala/L235Ala/Gly237Ala/P238Ser/His268Ala/Ala330Ser/Pro331Ser	ADCC; CDC
Ala330Leu	CDC
Asp270Ala	CDC
Lys322Ala	CDC

Pro329Ala	CDC
Pro331Ala	CDC
Val264Ala	CDC
Высокоманнозное гликозилирование	CDC
Phe241Ala	CDC
Asn297Ala, или Gly, или Gln	ADCC; ADCP; CDC
S228P/Phe234Ala/Leu235Ala	ADCC; CDC

Популяция клеток, экспрессирующих CAR, изготовленная посредством способов, раскрытых в данном документе

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении описана иммунная эффекторная клетка (например, Т-клетка или NK-клетка), например, полученная посредством любого из способов изготовления, описанных в данном документе, сконструированная таким образом, чтобы она экспрессировала CAR, где сконструированная иммунная эффекторная клетка демонстрирует противоопухолевое свойство. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Иллюстративный антиген представляет собой антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетку (например, Т-клетку или NK-клетку) трансформируют с помощью CAR, и CAR экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления клетку (например, Т-клетку или NK-клетку) трансдуцируют с помощью вирусного вектора, кодирующего CAR. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых таких вариантах осуществления клетка может стабильно экспрессировать CAR. В некоторых вариантах осуществления клетку (например, Т-клетку или NK-клетку) трансфицируют нуклеиновой кислотой, например, мРНК, кДНК или ДНК, кодирующей CAR. В некоторых таких вариантах осуществления клетка может транзиентно экспрессировать CAR.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрена популяция клеток (например, иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток), полученных посредством любого из способов изготовления, описанных в данном документе (например, способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе), сконструированных таким образом, чтобы они экспрессировали CAR.

В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток в конце способа изготовления (например, в конце способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в

данном документе) (1) является такой же, (2) отличается, например, на не более чем 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15%, или (3) является увеличенной, например, на по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25%, по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале способа изготовления (например, в начале способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток в конце способа изготовления (например, в конце способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, продолжительность которого составляет, например, более 26 часов (например, продолжительность которого составляет более 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней) или который предусматривает размножение популяции клеток in vitro в течение, например, более чем 3 дней (например, размножение популяции клеток in vitro в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней).

В некоторых вариантах осуществления процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток в конце способа изготовления (например, в конце способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе) составляет не менее 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%.

В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в конце способа изготовления (например, в конце способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе) (1) является такой же, (2) отличается, например, на не более чем 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15%, или (3) является уменьшенной, например, на по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25%, по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале способа изготовления (например, в начале способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток в конце способа изготовления (например, в конце способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе) демонстрирует более низкую процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти (например, на по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% ниже),

по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, продолжительность которого составляет, например, более 26 часов (например, продолжительность которого составляет более 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней) или который предусматривает размножение популяции клеток in vitro в течение, например, более чем 3 дней (например, размножение популяции клеток in vitro в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней).

В некоторых вариантах осуществления процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, центральных CD95+ Т-клеток памяти, в популяции клеток в конце способа изготовления (например, в конце способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе) составляет не более 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80%.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток в конце способа изготовления (например, в конце способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе) после введения in vivo персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% более высоком) (например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 1 в отношении фиг. 4C) по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, продолжительность которого составляет, например, более 26 часов (например, продолжительность которого составляет более 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней) или который предусматривает размножение популяции клеток in vitro в течение, например, более чем 3 дней (например, размножение популяции клеток in vitro в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней).

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток была обогащена клетками, экспрессирующими IL6R (например, клетками, которые являются положительными по IL6Rα и/или IL6Rβ), до начала способа изготовления (например, до начала способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит, например, не менее 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% клеток, экспрессирующих IL6R (например, клеток, которые являются положительными по IL6Rα и/или IL6Rβ), в начале способа изготовления (например, в начале способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе).

Фармацевтическая композиция

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе клеток, экспрессирующих CAR, и их применение в лекарственных препаратах или способах лечения, среди других заболеваний, рака или любого злокачественного новообразования или аутоиммунных заболеваний, в развитие которых вовлечены клетки или ткани, которые экспрессируют опухолевый антиген, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены

фармацевтические композиции, содержащие клетку, экспрессирующую CAR, например, множество клеток, экспрессирующих CAR, полученных посредством способа изготовления, описанного в данном документе (например, способа с использованием цитокинов или способа с использованием активации, описанных в данном документе), в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или наполнителями.

Химерный антигенный рецептор (CAR)

В настоящем изобретении предусмотрены иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки), сконструированные таким образом, что они содержат один или несколько CAR, которые направляют иммунные эффекторные клетки на раковое образование. Это достигается с помощью антигенсвязывающего домена в CAR, который является специфичным в отношении антигена, ассоциированного с раком. Существует два класса антигенов, ассоциированных с раком (опухолевых антигенов), на которые могут нацеливаться CAR, описанные в данном документе: (1) антигены, ассоциированные с раком, которые экспрессируются на поверхности раковых клеток; и (2) антигены, ассоциированные с раком, которые сами по себе являются внутриклеточными, однако фрагменты (пептиды) такого антигена презентируются на поверхности раковых клеток с помощью MHC (главного комплекса гистосовместимости).

Соответственно, иммунная эффекторная клетка, например, полученная посредством способа, описанного в данном документе, может быть сконструирована таким образом, чтобы она содержала CAR, нацеливающийся на один из следующих антигенов, ассоциированных с раком (опухолевых антигенов): CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелин, IL-11Ra, PSCA, VEGFR2, антиген Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, PRSS21, SSEA-4, CD20, рецептор фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазу, PAP, ELF2M, эфрин B2, рецептор IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназу, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, рецептор фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловую кислоту, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, легумаин, E6 и E7 HPV, MAGE-A1, MAGE A1, ETV6-AML, белок спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственный антиген 1, p53, мутантный p53, простеин, сурвивин и теломеразу, PCTA-1/галектин 8, MelanA/MART1, мутантный Ras, hTERT, антигены саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукт слитого гена TMPRSS2-ETS), NA17, PAX3, андрогеновый рецептор, циклин B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2, кишечную карбоксилэстеразу и мутантный вариант hsp70-2.

Последовательности из неограничивающих примеров различных компонентов,

которые могут быть частью молекулы CAR, описанной в данном документе, перечислены в **таблице 1**, где "а. к." обозначает аминокислоты, а "н. к." обозначает нуклеиновые кислоты, которые кодируют соответствующий пептид.

Таблица 1. Последовательности различных компонентов CAR

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
SEQ ID NO: 11	Промотор гена EF-1α (н. к.)	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAG AGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGT TGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTG CCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGG AAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTT TCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAG TGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGC AACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGT GCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCT TTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAAT TACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTT GATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG GAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCC CCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGC CTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCT GGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGA TGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAG ATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGC ACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGG CGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCAC ATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCG GCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTC GCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG GCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCG TGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCT GCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACC CACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTC

		AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTA CCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTT CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGT TGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTT CCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTT AGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCT TGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTG GTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA AGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA
SEQ ID NO: 1	Лидерная последовательность (а. к.)	MALPVTALLLPLALLLHAARP
SEQ ID NO: 12	Лидерная последовательность (н. к.)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGC CTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACC C
SEQ ID NO: 199	Лидерная последовательность (н. к.)	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTC CGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC C
SEQ ID NO: 2	Шарнирная область CD8 (а. к.)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACD
SEQ ID NO: 13	Шарнирная область CD8 (н. к.)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACA CCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCG GCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCT GGACTTCGCCTGTGAT
SEQ ID NO: 3	Шарнирная область Ig4 (а. к.)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKM
SEQ ID NO:	Шарнирная область	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCT

14	Ig4 (н. к.)	TGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCC AGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAG GTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAG GAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGC ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAA TACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTG CCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTG GTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA GAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAG CCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCA GGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGAT G
SEQ ID NO: 4	Шарнирная область IgD (а. к.)	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAP ATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPE CPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCF VVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLE RHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLN HPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSD PPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVN TSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSP QPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH
SEQ ID NO: 15	Шарнирная область IgD (н. к.)	AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCA TCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCAGGCA GAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCA

		CCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGC GGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAA AGAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGA CCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCT GGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAG GACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTT ACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAG GATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGA AAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGG GTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCA GAGCCAGCACTCAAGACTCACCCTTCCGAG ATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTCAC ATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCCA CAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCC GCCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAAT CTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCCAGAGGCC GCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGC TTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGC TGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGC GGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCCACCCCAG CCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGT GTCTTAAGGGTCCCAGCACCACCTAGCCCC CAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCC ATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTT CTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTG ACCATT
SEQ ID NO: 6	Трансмембранный домен CD8 (а. к.)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
SEQ ID NO: 17	Трансмембранный домен CD8 (н. к.)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTT GTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCAC CCTTTACTGC
SEQ ID NO: 7	Внутриклеточный домен 4-1BB (а. к)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL
SEQ ID NO: 18	Внутриклеточный домен 4-1BB (н. к.)	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATA TTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA

		ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGT GAACTG
SEQ ID NO: 8	CD27 (а. к.)	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTI PIQEDYRKPEPACSP
SEQ ID NO: 19	CD27 (н. к.)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCC GGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT GCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGC TCC
SEQ ID NO: 9	CD3-дзета (а. к.) (с мутацией Q/K)	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 20	CD3-дзета (н. к.) (с мутацией Q/K)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTC TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC CCCCTCGC
SEQ ID NO: 10	CD3-дзета (а. к.) (эталонная последовательность NM_000734.3 в NCBI)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 21	CD3-дзета (н. к.) (эталонная последовательность NM_000734.3 в	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTC TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAG GAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC

	NCBI)	CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA CCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC CCCCTCGC
SEQ ID NO: 36	Внутриклеточный домен CD28 (аминокислотная последовательность)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA PPRDFAAYRS
SEQ ID NO: 37	Внутриклеточный домен CD28 (нуклеотидная последовательность)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCC GGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT GCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGC TCC
SEQ ID NO: 38	Внутриклеточный домен ICOS (аминокислотная последовательность)	T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L
SEQ ID NO: 39	Внутриклеточный домен ICOS (нуклеотидная последовательность)	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCAC GACCCTAACGGTGAATACATGTTCATGAGA GCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTC ACAGATGTGACCCTA
SEQ ID NO: 5	Шарнирная область/линкер GS (а. к.)	GGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 16	Шарнирная область/линкер GS (н. к.)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
SEQ ID NO: 40	Шарнирная область/линкер GS (н. к.)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGGGGTTCC

SEQ ID NO: 25	Линкер	GGGGS
SEQ ID NO: 26	Линкер	(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)n, где n=1-6, например, GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 27	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 28	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 29	Линкер	GGGS
SEQ ID NO: 41	Линкер	(Gly-Gly-Gly-Ser)n, где n представляет собой положительное целое число, которое равняется или больше 1
SEQ ID NO: 42	Линкер	(Gly-Gly-Gly-Ser)n, где n=1-10, например, GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS
SEQ ID NO: 43	Линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
SEQ ID NO: 30	Поли(A)	$(A)_{5000}$ Эта последовательность может охватывать 50-5000 адениновых оснований.
SEQ ID NO: 31	Поли(T)	$(T)_{100}$
SEQ ID NO: 32	Поли(T)	$(T)_{5000}$ Эта последовательность может охватывать 50-5000 тиминовых оснований.
SEQ ID NO: 33	Поли(A)	$(A)_{5000}$ Эта последовательность может охватывать 100-5000 адениновых оснований.
SEQ ID NO: 34	Поли(A)	$(A)_{400}$ Эта последовательность может охватывать 100-400 адениновых оснований.
SEQ ID NO:	Поли(A)	$(A)_{2000}$

35		Эта последовательность может охватывать 50-2000 адениновых оснований.
SEQ ID NO: 22	CAR на основе PD1 (а. к.)	pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwy rmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarr ndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagq fqtlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdi yiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedg cscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeyd vldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmk gerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
SEQ ID NO: 23	CAR на основе PD-1 (н. к.) (ECD PD1 подчеркнут)	atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctcgcactcctgctccac gccgctagaccacccggatggtttctggactctccggatcgcccgtgga atcccccaaccttctcaccggcactcttggttgtgactgagggcgataat gcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgctgaa ctggtaccgcatgagcccgtcaaaccagaccgacaagctcgccgcgtt tccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttccgcgtgac tcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgctag gcgaaacgactccgggacctacctgtgcggagccatctcgctggcgc ctaaggcccaaatcaaagagagcttgagggccgaactgagagtgacc gagcgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgcctcgg cctgcggggcagtttcagaccctggtcacgaccactccggcgccgcg cccaccgactccggccccaactatcgcgagccagcccctgtcgctgag gccggaagcatgccgccctgccgccggaggtgctgtgcatacccggg gattggacttcgcatgcgacatctacatttgggctcctctcgccggaactt gtggcgtgctccttctgtccctggtcatcaccctgtactgcaagcggggt cggaaaaagcttctgtacattttcaagcagcccttcatgaggcccgtgca aaccacccaggaggaggacggttgctcctgccggttccccgaagagg aagaaggaggttgcgagctgcgcgtgaagttctcccggagcgccgac gcccccgcctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaa cctgggacggcgggaagagtacgatgtgctggacaagcggcgcggc cgggaccccgaaatgggcgggaagcctagaagaaagaaccctcagg aaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgaggcctac tccgaaattgggatgaagggagagcggcggaggggaaaggggcac gacggcctgtaccaaggactgtccaccgccaccaaggacacatacgat gccctgcacatgcaggcccttcccccctcgc

SEQ ID NO: 24	CAR на основе PD-1 с сигнальной последовательностью (а. к.) (ECD PD1 подчеркнут)	Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtegd natftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcrfr vtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvte rraevptahpspsprpagqfqtlvtttpaprpptpaptiasqplslrpea crpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkll yifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqegly nelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalh mqalppr

Биспецифические CAR

В некоторых вариантах осуществления молекула полиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело характеризуется специфичностью в отношении не более чем двух антигенов. Молекула биспецифического антитела характеризуется наличием первой последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания с первым эпитопом, и второй последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В некоторых вариантах осуществления первый и второй эпитопы перекрываются. В некоторых вариантах осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются. В некоторых вариантах осуществления первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например, на разных белках (или на разных субъединицах мультимерного белка). В некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые характеризуются специфичностью связывания с первым эпитопом, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые характеризуются специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела содержит полуантитело, характеризующееся специфичностью связывания с первым эпитопом, и полуантитело, характеризующееся специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела содержит полуантитело или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания с первым эпитопом, и полуантитело или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела содержит scFv или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания с первым эпитопом, и scFv или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания со вторым эпитопом.

В определенных вариантах осуществления молекула антитела представляет собой молекулу полиспецифического (например, биспецифического или триспецифического) антитела. Протоколы для получения молекул биспецифических или гетеродимерных антител и различные конфигурации молекул биспецифических антител описаны, например, в абзацах 455-458 WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела характеризуется наличием первой последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, например, scFv, которая характеризуется специфичностью связывания с CD19, например, содержит scFv, описанный в данном документе, или содержит CDR легкой цепи и/или CDR тяжелой цепи из scFv, описанного в данном документе, и второй последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания со вторым эпитопом на другом антигене.

Химерный TCR

В некоторых вариантах осуществления антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению (например, антитела к CD19 и их фрагменты) могут быть пересажены на один или несколько константных доменов цепи Т-клеточного рецептора ("TCR"), например, альфа-цепи TCR или бета-цепи TCR, с созданием химерного TCR. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что химерные TCR будут передавать сигналы через комплекс TCR при связывании антигена. Например, scFv, раскрытый в данном документе, можно пересадить на константный домен, например, на по меньшей мере часть внеклеточного константного домена, трансмембранного домена и цитоплазматического домена, цепи TCR, например, альфа-цепи TCR и/или бета-цепи TCR. В качестве другого примера, фрагмент антитела, например, VL-домен, описанный в данном документе, можно пересадить на константный домен альфа-цепи TCR, и фрагмент антитела, например, VH-домен, описанный в данном документе, можно пересадить на константный домен бета-цепи TCR (или в качестве альтернативы VL-домен можно пересадить на константный домен бета-цепи TCR, а VH-домен можно пересадить на альфа-цепь TCR). В качестве другого примера, CDR антитела или фрагмента антитела можно пересадить на альфа- и/или бета-цепь TCR с созданием химерного TCR. Например, раскрытые в данном документе LCDR можно пересадить на вариабельный домен альфа-цепи TCR, а раскрытые в данном документе HCDR можно пересадить на вариабельный домен бета-цепи TCR или наоборот. Такие химерные TCR можно получить, например, посредством способов, известных из уровня техники (например, Willemsen RA et al., Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al, Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al, Gene Ther. 2012 Apr;19(4):365-74).

Каркасные структуры, отличные от антител

В ряде вариантов осуществления антигенсвязывающий домен содержит каркасную структуру, отличную от антитела, например, фибронектин, анкирин, доменное антитело, липокалин, малое модульное иммунофармацевтическое средство, максиантитело, белок А

или аффилин. Каркасная структура, отличная от антитела, обладает способностью связываться с антигеном-мишенью на клетке. В ряде вариантов осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой полипептид или его фрагмент из встречающегося в природе белка, экспрессируемого на клетке. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит каркасную структуру, отличную от антитела. Можно использовать большое разнообразие каркасных структур, отличных от антител, при условии, что полученный в результате полипептид содержит по меньшей мере одну связывающую область, которая специфично связывается с антигеном-мишенью на клетке-мишени.

Каркасные структуры, отличные от антител, включают фибронектин (Novartis, Массачусетс), анкирин (Molecular Partners AG, Цюрих, Швейцария), доменные антитела (Domantis, Ltd., Кембридж, Массачусетс и Ablynx NV, Звейнарде, Бельгия), липокалин (Pieris Proteolab AG, Фрайзинг, Германия), малые модульные иммунофармацевтические средства (Trubion Pharmaceuticals Inc., Сиэтл, Вашингтон), максиантитела (Avidia, Inc., Маунтин-Вью, Калифорния), белок А (Affibody AG, Швеция) и аффилин (гамма-кристаллин или убиквитин) (Scil Proteins GmbH, Галле, Германия).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит внеклеточный домен или его противолигандсвязывающий фрагмент из молекулы, которая связывает противолиганд на поверхности клетки-мишени.

Иммунные эффекторные клетки могут содержать рекомбинантную ДНК-конструкцию, содержащую последовательности, кодирующие CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела, TCR или фрагмент TCR), который специфично связывается с опухолевым антигеном, например, опухолевым антигеном, описанным в данном документе, и внутриклеточный сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий сигнальный домен и/или первичный сигнальный домен, например, дзета-цепь. Как описано в другом месте, способы, описанные в данном документе, могут включать трансдукцию клетки, например, из популяции, истощенной по регуляторным Т-клеткам, нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, например, CAR, описанный в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит scFv-домен, где перед scFv может располагаться необязательная лидерная последовательность, такая как представленная под SEQ ID NO: 1, и за ней может располагаться необязательная последовательность шарнирной области, такая как представленная под SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 36, или SEQ ID NO: 38, трансмембранная область, такая как представленная под SEQ ID NO: 6, внутриклеточный сигнальный домен, который содержит SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 16, и последовательность CD3-дзета, которая содержит SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, например, где домены являются смежными и находятся в одной и той же рамке считывания, образуя единый слитый белок.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные конструкции CAR

содержат необязательную лидерную последовательность (например, лидерную последовательность, описанную в данном документе), внеклеточный антигенсвязывающий домен (например, антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе), шарнирную область (например, шарнирную область, описанную в данном документе), трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, описанный в данном документе) и внутриклеточный стимулирующий домен (например, внутриклеточный стимулирующий домен, описанный в данном документе). В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция CAR содержит необязательную лидерную последовательность (например, лидерную последовательность, описанную в данном документе), внеклеточный антигенсвязывающий домен (например, антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе), шарнирную область (например, шарнирную область, описанную в данном документе), трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, описанный в данном документе), внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен (например, костимулирующий сигнальный домен, описанный в данном документе) и/или внутриклеточный первичный сигнальный домен (например, первичный сигнальный домен, описанный в данном документе).

Иллюстративная лидерная последовательность представлена под SEQ ID NO: 1. Иллюстративная последовательность шарнирной области/спейсера представлена под SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 36, или SEQ ID NO: 38. Иллюстративная последовательность трансмембранного домена представлена под SEQ ID NO: 6. Иллюстративная последовательность внутриклеточного сигнального домена белка 4-1BB представлена под SEQ ID NO: 7. Иллюстративная последовательность внутриклеточного сигнального домена CD27 представлена под SEQ ID NO: 16. Иллюстративная последовательность домена CD3-дзета представлена под SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка содержит рекомбинантную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, где молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающий домен, где последовательность является смежной с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей внутриклеточный сигнальный домен, и находится с ней в одной и той же рамке считывания. Иллюстративный внутриклеточный сигнальный домен, который может использоваться в CAR, включает без ограничения один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов, например, CD3-дзета, CD28, CD27, 4-1BB и т. п. В некоторых случаях CAR может содержать любую комбинацию из CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т. п.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие требуемые молекулы, можно получить с помощью рекомбинантных способов, известных из уровня техники, как, например, путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих молекулу нуклеиновой кислоты, путем получения молекулы нуклеиновой кислоты из вектора, о котором известно, что он ее содержит, или путем непосредственного выделения из клеток

и тканей, содержащих ее, с помощью стандартных методик. В качестве альтернативы нуклеиновая кислота, представляющая интерес, может быть получена путем синтеза, а не клонирования.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, можно вводить в иммунные эффекторные клетки с помощью, например, ретровирусных или лентивирусных векторных конструкций.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, также можно вводить в иммунную эффекторную клетку с помощью, например, РНК-конструкции, которая может быть непосредственно введена в клетку путем трансфекции. Способ получения мРНК для применения в трансфекции включает обеспечение транскрипции in vitro (IVT) матрицы с использованием специально разработанных праймеров с последующим добавлением поли(A) с получением конструкции, содержащей последовательности 3'- и 5'-нетранслируемых областей ("UTR") (например, 3'- и/или 5'-UTR, описанных в данном документе), 5'-кэп (например, 5'-кэп, описанный в данном документе) и/или участок внутренней посадки рибосомы (IRES) (например, IRES, описанный в данном документе), нуклеиновую кислоту, которая должна экспрессироваться, и поли(A)-хвост, как правило, длиной 50-2000 оснований (например, описанный в примерах, например, под SEQ ID NO: 35). С помощью РНК, полученной таким образом, можно эффективно трансфицировать различные типы клеток. В некоторых вариантах осуществления матрица содержит последовательности для CAR. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе РНК, кодирующей CAR, вводят путем трансдукции в клетку, например, Т-клетку, с помощью электропорации.

Антигенсвязывающий домен

В некоторых вариантах осуществления множество иммунных эффекторных клеток, например, популяция, истощенная по регуляторным Т-клеткам, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, которая содержит специфичный в отношении мишени связывающий элемент, иначе называемый антигенсвязывающим доменом. Выбор связывающего элемента зависит от типа и количества лигандов, которые определяют поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен может быть выбран таким образом, чтобы он распознавал лиганд, который выступает в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с конкретным болезненным состоянием. Таким образом, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут выступать в качестве лигандов для антигенсвязывающего домена в CAR, описанного в данном документе, включают маркеры, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунным заболеванием и раковыми клетками.

В некоторых вариантах осуществления часть CAR, содержащая антигенсвязывающий домен, содержит антигенсвязывающий домен, который нацеливается на опухолевый антиген, например, на опухолевый антиген, описанный в данном документе.

Антигенсвязывающий домен может представлять собой любой домен, который связывается с антигеном, в том числе без ограничения моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело и их функциональный фрагмент, в том числе без ограничения однодоменное антитело, такое как вариабельный домен тяжелой цепи (VH), вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен (VHH) нанотела верблюдовых, а также альтернативную каркасную структуру, которая, как известно из уровня техники, функционирует в качестве антигенсвязывающего домена, такую как рекомбинантный фибронектиновый домен, Т-клеточный рецептор (TCR) или его фрагмент, например, одноцепочечный TCR, и т. п. В некоторых случаях целесообразно, чтобы антигенсвязывающий домен был получен из того же вида, в организме которого в конечном итоге будет применяться CAR. Например, для применения у людей может быть целесообразно, чтобы антигенсвязывающий домен CAR содержал человеческие или гуманизированные остатки в антигенсвязывающем домене антитела или фрагмента антитела.

CAR для CD19

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, представляет собой клетку, экспрессирующую CAR для CD19 (например, клетку, экспрессирующую CAR, который связывается с CD19 человека).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR для CD19 характеризуется такой же или сходной специфичностью связывания по сравнению с scFv-фрагментом FMC63, описанным в Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR для CD19 включает в себя scFv-фрагмент, описанный в Nicholson et al. Mol. Immun. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997).

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит антигенсвязывающий домен (например, гуманизированный антигенсвязывающий домен) согласно таблице 3 из WO2014/153270, включенной в данный документ посредством ссылки. В WO2014/153270 также описаны способы анализа связывания и эффективности различных конструкций CAR.

В некоторых вариантах осуществления исходная последовательность scFv мыши представляет собой конструкцию CAR19, представленную в публикации согласно PCT WO2012/079000 (включенной в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD19, представляет собой scFv, описанный в WO2012/079000.

В некоторых вариантах осуществления молекула CAR содержит последовательность слитого полипептида, представленную под SEQ ID NO: 12 в публикации согласно PCT WO2012/079000, в которой представлен scFv-фрагмент мышиного происхождения, который специфично связывается с CD19 человека.

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит аминокислотную

последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 в публикации согласно PCT WO2012/079000.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность представляет собой

Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediaty fcqqgntlpytfgggtkleitggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviw gsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvssttpaprpptpaptiasqplslr peacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkf srsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdgl yqglstatkdtydalhmqalppr (SEQ ID NO: 292) или последовательность, по существу гомологичную ей.

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 имеет обозначение согласно USAN тисагенлеклейсел-Т. В ряде вариантов осуществления CTL019 получают посредством генной модификации Т-клеток, опосредованной стабильной вставкой путем трансдукции с помощью самоинактивирующегося лентивирусного (LV) вектора, дефектного по репликации, содержащего трансген CTL019 под контролем промотора гена EF-1-альфа. CTL019 может представлять собой смесь положительных и отрицательных по трансгену Т-клеток, которые доставляются субъекту, исходя из процентной доли Т-клеток, положительных по трансгену.

В других вариантах осуществления CAR для CD19 содержит антигенсвязывающий домен (например, гуманизированный антигенсвязывающий домен) согласно таблице 3 из WO2014/153270, включенной в данный документ посредством ссылки.

Гуманизация антитела к CD19 мыши необходима для клинических условий, когда специфические для мышей остатки могут индуцировать ответ с образованием антител человека к антигенам мыши (HAMA) у пациентов, которые получают лечение с помощью CART19, т. е. лечение с помощью Т-клеток, трансдуцированных конструкцией CAR19. Получение, определение характеристик и эффективность гуманизированных последовательностей CAR для CD19 описаны в международной заявке WO2014/153270, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, включая примеры 1-5 (стр. 115-159).

В некоторых вариантах осуществления молекула CAR представляет собой гуманизированный CAR для CD19, содержащий следующую аминокислотную последовательность:

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKГGGGSGGGGSGGGG SQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKГLEWIGVIWGSETTYY QSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 293)

В некоторых вариантах осуществления молекула CAR представляет собой гуманизированный CAR для CD19, содержащий следующую аминокислотную

последовательность:

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHS
GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGG
SGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWG
SETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYW
GQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP
LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
(SEQ ID NO: 294)

В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для CD19, например, антигенсвязывающий домен для CD19 из любого известного CAR для CD19. Например, CAR для CD19 LG-740 описан в патенте США № 8399645; патенте США № 7446190; Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54(2):255-260(2012); Cruz et al., Blood 122(17):2965-2973 (2013); Brentjens et al., Blood, 118(18):4817-4828 (2011); Kochenderfer et al., Blood 116(20):4099-102 (2010); Kochenderfer et al., Blood 122 (25):4129-39 (2013) и 16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15-18, Salt Lake City) 2013, Abst 10.

Иллюстративные CAR для CD19 включают CAR для CD19, описанные в данном документе, или CAR для CD19, описанный в Xu et al. Blood 123.24(2014):3750-9; Kochenderfer et al. Blood 122.25(2013):4129-39, Cruz et al. Blood 122.17(2013):2965-73, NCT00586391, NCT01087294, NCT02456350, NCT00840853, NCT02659943, NCT02650999, NCT02640209, NCT01747486, NCT02546739, NCT02656147, NCT02772198, NCT00709033, NCT02081937, NCT00924326, NCT02735083, NCT02794246, NCT02746952, NCT01593696, NCT02134262, NCT01853631, NCT02443831, NCT02277522, NCT02348216, NCT02614066, NCT02030834, NCT02624258, NCT02625480, NCT02030847, NCT02644655, NCT02349698, NCT02813837, NCT02050347, NCT01683279, NCT02529813, NCT02537977, NCT02799550, NCT02672501, NCT02819583, NCT02028455, NCT01840566, NCT01318317, NCT01864889, NCT02706405, NCT01475058, NCT01430390, NCT02146924, NCT02051257, NCT02431988, NCT01815749, NCT02153580, NCT01865617, NCT02208362, NCT02685670, NCT02535364, NCT02631044, NCT02728882, NCT02735291, NCT01860937, NCT02822326, NCT02737085, NCT02465983, NCT02132624, NCT02782351, NCT01493453, NCT02652910, NCT02247609, NCT01029366, NCT01626495, NCT02721407, NCT01044069, NCT00422383, NCT01680991, NCT02794961 или NCT02456207, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержат последовательность, например, CDR, VH, VL, scFv или полную последовательность CAR, раскрытую в таблице 2, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности иллюстративных молекул,

связывающихся с CD19

SEQ ID NO	**Область**	**Последовательность**
CTL019		
295	HCDR1 (Kabat)	DYGVS
296	HCDR2 (Kabat)	VIWGSETTYYNSALKS
297	HCDR3 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
298	LCDR1 (Kabat)	RASQDISKYLN
299	LCDR2 (Kabat)	HTSRLHS
300	LCDR3 (Kabat)	QQGNTLPYT
301	Полная аминокислотная последовательность CTL019	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
302	Полная нуклеотидная последовательность CTL019	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCC TGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGC CAGGCCGGACATCCAGATGACACAGAC TACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGA GACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCA AGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAAT TGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACT GTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAA

		GATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATT ATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGC AAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCA ACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCA CAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTG GGTCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGA AACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGG TGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCA CATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACC CGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCA GCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCT GGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCAC ATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAG ACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAA GAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAG TCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTA CTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGT GGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGC CAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCA ACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGC CGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCAC ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGG ACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGG TTATCACCCTTTACTGCAAACGGGGCA GAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAAC AACCATTTATGAGACCAGTACAAACTA CTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCC GATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGA TGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGG AGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAG

		GGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGAC CCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA TGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA GGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG CGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACG ATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTC ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
303	scFv-домен CTL019	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGV PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGG SGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCT VSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTSVTVSS
Гуманизированный CAR2		
295	HCDR1 (Kabat)	DYGVS
304	HCDR2 (Kabat)	VIWGSETTYYQSSLKS
297	HCDR3 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
298	LCDR1 (Kabat)	RASQDISKYLN
299	LCDR2 (Kabat)	HTSRLHS
300	LCDR3 (Kabat)	QQGNTLPYT
293	scFv-домен CAR2 - а. к. (линкер подчеркнут)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIS KYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQGNTLPYTFGQGTKLEIK<u>GGGGSGGGG</u> <u>SGGGGS</u>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCT VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVI

		WGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTLVTVSS
305	scFv-домен CAR2 - н. к.	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgc tccacgccgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgc cactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaa gcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccgg ctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgg gaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggact tcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctt tggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcag cggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaac tccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctt tcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggg gtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatgga ttggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccct caagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagg tgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtg tactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg gattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagccacca ccatcatcaccatcaccat
306	CAR2 - полный - а. к.	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSP ATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPY TFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYY QSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT LVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

		RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
307	CAR2 - полный - н. к.	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgc tccacgccgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgc cactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaa gcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccgg ctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgg gaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggact tcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctt tggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcag cggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaac tccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctt tcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggg gtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatgga ttggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccct caagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagg tgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtg tactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg gattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccac taccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcc tcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctt tcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctg ctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactc aagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcag atgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacga actcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag cggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg

		ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggga acgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggac tcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcag gccctgccgcctcgg
349	CAR 2A - полная аминокислотная последовательность ; сигнальный пептид подчеркнут	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSP ATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPY TFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYY QSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT LVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
225	CAR 2A - аминокислотная последовательность ; сигнальный пептид отсутствует	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIS KYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGG SGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCT VSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVI WGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ

		LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR
354	CAR 2A - полная последовательность нуклеиновой кислоты; сигнальный пептид и стоп-кодон подчеркнуты	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgc tccacgccgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgc cactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaa gcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccgg ctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgg gaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggact tcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctt tggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcag cggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaac tccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctt tcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggg gtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatgga ttggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccct caagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagg tgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtg tactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg gattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccac taccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcc tcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctt tcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctg ctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactc aagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcag atgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacga actcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag cggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggga

		acgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggac tcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcag gccctgccgcctcggtaa
355	CAR 2A - последовательность нуклеиновой кислоты; сигнальный пептид подчеркнут; стоп-кодон отсутствует	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgc tccacgccgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgc cactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaa gcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccgg ctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgg gaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggact tcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctt tggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcag cggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaac tccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctt tcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggg gtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatgga ttggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccct caagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagg tgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtg tactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg gattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccac taccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcc tcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctt tcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctg ctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactc aagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcag atgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacga actcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag cggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggga acgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggac

		tcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcag gccctgccgcctcgg
356	CAR 2A - последовательность нуклеиновой кислоты; сигнальный пептид отсутствует; стоп-кодон подчеркнут	gaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccc ggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctc aaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctc gccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctg ccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcact atcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagc aagggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagct cgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccgg cggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgg gtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgag cggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagc caccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctct gagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatct caaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctg tgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattact attatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtact ctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccac ccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccc ggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggc tggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttact gtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccc ttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttc atgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcg cgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcag ggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag aggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccca gaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctat agcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagga cacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcggtaa
SEQ ID NO: 417	CAR 2A -	gaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccc

	последовательность нуклеиновой кислоты; сигнальный пептид отсутствует; стоп-кодон отсутствует	ggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctc aaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctc gccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctg ccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcact atcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagc aagggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagct cgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccgg cggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgg gtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgag cggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagc caccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctct gagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatct caaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctg tgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattact attatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtact ctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccac ccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccc ggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggc tggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttact gtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccc ttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttc atgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcg cgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag aggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccca gaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctat agcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagga cacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
SEQ ID NO: 250	VH для CD19	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETT YYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ

		GTLVTVSS
SEQ ID NO: 251	VL для CD19	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIS KYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQGNTLPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 331	VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPGKCLEWIGVIWGSETT YYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTLVTVSS
SEQ ID NO: 332	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIS KYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQGNTLPYTFGCGTKLEIK

CAR для BCMA

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, представляет собой клетку, экспрессирующую CAR для BCMA (например, клетку, экспрессирующую CAR, который связывается с BCMA человека). Иллюстративные CAR для BCMA могут включать последовательности, раскрытые в таблице 1 или 16 из WO2016/014565, включенной в данный документ посредством ссылки. Конструкция CAR для BCMA может содержать необязательную лидерную последовательность; необязательный шарнирный домен, например, шарнирный домен CD8; трансмембранный домен, например, трансмембранный домен CD8; внутриклеточный домен, например, внутриклеточный домен 4-1BB; и функциональный сигнальный домен, например, домен CD3-дзета. В определенных вариантах осуществления домены являются смежными и находятся в одной и той же рамке считывания, образуя единый слитый белок. В других вариантах осуществления домены находятся в отдельных полипептидах, как, например, в молекуле RCAR, описанной в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления молекула CAR для BCMA содержит одну или несколько CDR, VH, VL, scFv или полноразмерных последовательностей BCMA-1, BCMA-2, BCMA-3, BCMA-4, BCMA-5, BCMA-6, BCMA-7, BCMA-8, BCMA-9, BCMA-10, BCMA-11, BCMA-12, BCMA-13, BCMA-14, BCMA-15, 149362, 149363, 149364, 149365, 149366, 149367, 149368, 149369, BCMA_EBB-C1978-A4, BCMA_EBB-C1978-G1, BCMA_EBB-C1979-C1, BCMA_EBB-C1978-C7, BCMA_EBB-C1978-D10, BCMA_EBB-C1979-C12, BCMA_EBB-C1980-G4, BCMA_EBB-C1980-D2, BCMA_EBB-C1978-A10, BCMA_EBB-C1978-D4, BCMA_EBB-C1980-A2, BCMA_EBB-C1981-C3, BCMA_EBB-C1978-G4, A7D12.2, C11D5.3, C12A3.2 или C13F12.1, раскрытых в WO2016/014565, или

последовательность, по существу (например, на 95-99%) идентичную им.

Дополнительные иллюстративные последовательности, нацеливающиеся на BCMA, которые можно использовать в конструкциях CAR для BCMA, раскрыты в WO 2017/021450, WO 2017/011804, WO 2017/025038, WO 2016/090327, WO 2016/130598, WO 2016/210293, WO 2016/090320, WO 2016/014789, WO 2016/094304, WO 2016/154055, WO 2015/166073, WO 2015/188119, WO 2015/158671, US 9243058, US 8920776, US 9273141, US 7083785, US 9034324, US 2007/0049735, US 2015/0284467, US 2015/0051266, US 2015/0344844, US 2016/0131655, US 2016/0297884, US 2016/0297885, US 2017/0051308, US 2017/0051252, US 2017/0051252, WO 2016/020332, WO 2016/087531, WO 2016/079177, WO 2015/172800, WO 2017/008169, US 9340621, US 2013/0273055, US 2016/0176973, US 2015/0368351, US 2017/0051068, US 2016/0368988 и US 2015/0232557, включенных в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления дополнительные иллюстративные конструкции CAR для BCMA получают с использованием последовательностей VH и VL из публикации согласно PCT WO2012/0163805 (содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления CAR для BCMA содержат последовательность, например, CDR, VH, VL, scFv или полную последовательность CAR, раскрытую в таблицах 3-15, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней. В одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит антитело человека или фрагмент антитела человека. В некоторых вариантах осуществления человеческий домен, связывающий BCMA, содержит одну или несколько (например, все три) из CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC человеческого домена, связывающего BCMA, описанного в данном документе (например, в таблицах 3-10 и 12-15), и/или одну или несколько (например, все три) из CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC человеческого домена, связывающего BCMA, описанного в данном документе (например, в таблицах 3-10 и 12-15). В некоторых вариантах осуществления человеческий домен, связывающий BCMA, содержит VL человека, описанную в данном документе (например, в таблицах 3, 7 и 12), и/или VH человека, описанную в данном документе (например, в таблицах 3, 7 и 12). В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий BCMA, представляет собой scFv, содержащий VL и VH с аминокислотной последовательностью из таблиц 3, 7 и 12. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий BCMA (например, scFv), содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности, представленной в таблицах 3, 7 и 12, или последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью из таблиц 3, 7 и 12; и/или VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации

(например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности, представленной в таблицах 3, 7 и 12, или последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью из таблиц 3, 7 и 12.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из PALLAS

SEQ ID NO	**Название/описание**	**Последовательность**
R1B6		
SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 46	HCDR3 (Kabat)	REWVPYDVSWYFDY
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
SEQ ID NO: 46	HCDR3 (Chothia)	REWVPYDVSWYFDY
SEQ ID NO: 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
SEQ ID NO: 51	HCDR3 (IMGT)	ARREWVPYDVSWYFDY
SEQ ID NO: 52	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARREWVPYDVSWYFDYWGQ GTLVTVSS
SEQ ID NO: 53	ДНК VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAG GACTGGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCG CTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCT

		TCTCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGA CAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGG TGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAG CACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCC GCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCT GAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTAC TGCGCTAGACGGGAGTGGGTGCCCTACG ATGTCAGCTGGTACTTCGACTACTGGGGA CAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCTCC
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
SEQ ID NO: 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPLTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 62	ДНК VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTC CCTCTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCA

		CGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCAT CTCCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAG AAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGA TCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGC GTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTC AGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGC AGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACAT ACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCT CTGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGG AGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 64	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARREWVPYDVSWYFDYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 65	ДНК scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAG GACTGGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCG CTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCT TCTCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGA CAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGG TGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAG CACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCC GCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCT GAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTAC TGCGCTAGACGGGAGTGGGTGCCCTACG ATGTCAGCTGGTACTTCGACTACTGGGGA CAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCTCCGG TGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCG

		GGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGG TCGGACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTC CTCCCTCTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCG TCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAG CATCTCCAGCTACCTGAACTGGTACCAGC AGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCT GATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCG GCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGC TCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAG CAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACA TACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCC TCTGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTG GAGATCAAG
SEQ ID NO: 66	Полная аминокислотная последовательность CAR	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARREWVPYDVSWYFDYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 67	Полная последовательность ДНК CAR	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAG GACTGGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCG CTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCT TCTCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGA CAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGG TGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAG

		CACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCC GCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCT GAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTAC TGCGCTAGACGGGAGTGGGTGCCCTACG ATGTCAGCTGGTACTTCGACTACTGGGGA CAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCTCCGG TGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCG GGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGG TCGGACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTC CTCCCTCTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCG TCACGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAG CATCTCCAGCTACCTGAACTGGTACCAGC AGAAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCT GATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCG GCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGC TCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAG CAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACA TACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCC TCTGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTG GAGATCAAGACCACTACCCCAGCACCGA GGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCC TCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGC ATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTG CATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGA TATCTACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTA CTTGCGGGGTCCTGCTGCTTTCACTCGTG ATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAA GAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCT TCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGA GGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGC GCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGC TCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAG CTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAG

		AGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGG AAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGG GCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAA GATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGT ATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAA GGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCA GCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGC TCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCCTCGG
R1F2		
SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 68	HCDR3 (Kabat)	REWWYDDWYLDY
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
SEQ ID NO: 68	HCDR3 (Chothia)	REWWYDDWYLDY
SEQ ID NO: 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
SEQ ID NO: 69	HCDR3 (IMGT)	ARREWWYDDWYLDY
SEQ ID NO: 70	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARREWWYDDWYLDYWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO:	ДНК VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAG

71		GACTGGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCG CTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCT TCTCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGA CAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGG TGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAG CACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCC GCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCT GAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTAC TGCGCTAGACGGGAGTGGTGGTACGACG ATTGGTACCTGGACTACTGGGGACAGGG CACTCTCGTGACTGTGTCCTCC
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
SEQ ID NO: 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 62	ДНК VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTC CCTCTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCA CGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCAT CTCCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAG AAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGA TCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGC GTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTC AGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGC AGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACAT ACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCT CTGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGG AGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 72	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARREWWYDDWYLDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 73	ДНК scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAG GACTGGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCG CTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCT TCTCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGA CAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGG TGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAG CACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCC GCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCT GAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTAC TGCGCTAGACGGGAGTGGTGGTACGACG ATTGGTACCTGGACTACTGGGGACAGGG

		CACTCTCGTGACTGTGTCCTCCGGTGGTG GTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCGGGCGG AGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCT CTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACG ATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCT CCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAA GCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATC TACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGT CCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTCAG GCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGC CTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACT ACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTG ACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGA TCAAG
SEQ ID NO: 74	Полная аминокислотная последовательность CAR	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARREWWYDDWYLDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 75	Полная последовательность ДНК CAR	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAG GACTGGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCG CTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCT TCTCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGA

		CAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGG TGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAG CACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCC GCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCT GAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTAC TGCGCTAGACGGGAGTGGTGGTACGACG ATTGGTACCTGGACTACTGGGGACAGGG CACTCTCGTGACTGTGTCCTCCGGTGGTG GTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCGGGCGG AGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCT CTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACG ATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCT CCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAA GCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATC TACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGT CCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTCAG GCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGC CTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACT ACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTG ACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGA TCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCC ACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGT AGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATA CCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATC TACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTG CGGGGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCA CTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAGAA GCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCA TGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGA GGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCAGAG GAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCG TGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCC

		AGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTC TACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAG AGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAG AGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAA GCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGC CTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGA TGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTAT GAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGG CCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGC ACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTC TTCACATGCAGGCCCTGCCGCCTCGG
R1G5		
SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 76	HCDR3 (Kabat)	REWWGESWLFDY
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
SEQ ID NO: 76	HCDR3 (Chothia)	REWWGESWLFDY
SEQ ID NO: 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
SEQ ID NO: 77	HCDR3 (IMGT)	ARREWWGESWLFDY
SEQ ID NO: 78	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARREWWGESWLFDYWGQGT

		LVTVSS
SEQ ID NO: 79	ДНК VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAG GACTGGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCG CTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCT TCTCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGA CAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGG TGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAG CACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCC GCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCT GAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTAC TGCGCTAGACGGGAGTGGTGGGGAGAAA GCTGGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGG CACTCTCGTGACTGTGTCCTCC
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
SEQ ID NO: 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS

		RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPLTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 62	ДНК VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTC CCTCTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCA CGATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCAT CTCCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAG AAGCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGA TCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGC GTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTC AGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGC AGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACAT ACTACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCT CTGACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGG AGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 80	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARREWWGESWLFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 81	ДНК scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAG GACTGGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCG CTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCT TCTCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGA CAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGG TGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAG CACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCC GCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCT GAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTAC

		TGCGCTAGACGGGAGTGGTGGGGAGAAA GCTGGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGG CACTCTCGTGACTGTGTCCTCCGGTGGTG GTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCGGGCGG AGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCT CTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACG ATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCT CCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAA GCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATC TACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGT CCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTCAG GCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGC CTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACT ACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTG ACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGA TCAAG
SEQ ID NO: 82	Полная аминокислотная последовательность CAR	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARREWWGESWLFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 83	Полная последовательность ДНК	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAG GACTGGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCG

	CAR	CTTGAGCTGCGCAGCCTCAGGCTTTACCT TCTCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCAGA CAGGCTCCCGGGAAGGGACTGGAATGGG TGTCCGCCATTAGCGGTTCCGGCGGAAG CACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCC GCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAG AACACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCT GAGGGCCGAAGATACCGCGGTGTACTAC TGCGCTAGACGGGAGTGGTGGGGAGAAA GCTGGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGG CACTCTCGTGACTGTGTCCTCCGGTGGTG GTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCGGGCGG AGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCT CTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACG ATCACGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCT CCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAA GCCAGGGAAGGCACCGAAGCTCCTGATC TACGCCGCTAGCTCGCTGCAGTCCGGCGT CCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCTCAG GCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGC CTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACT ACTGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTG ACCTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGA TCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCC ACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGT AGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATA CCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATC TACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTG CGGGGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCA CTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAGAA GCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCA TGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGA GGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCAGAG

		GAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCG TGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCC AGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTC TACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAG AGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAG AGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAA GCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGC CTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGA TGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTAT GAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGG CCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGC ACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTC TTCACATGCAGGCCCTGCCGCCTCGG

Таблица 4. CDR по Kabat иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из PALLAS

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	SYAMS (SEQ ID NO: 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (SEQ ID NO: 45)	REWVPYDVS WYFDY (SEQ ID NO: 46)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO: 54)	AASSLQ S (SEQ ID NO: 55)	QQSYST PLT (SEQ ID NO: 56)
R1F2	SYAMS (SEQ ID NO: 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (SEQ ID NO: 45)	REWWYDDW YLDY (SEQ ID NO: 68)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO: 54)	AASSLQ S (SEQ ID NO: 55)	QQSYST PLT (SEQ ID NO: 56)
R1G5	SYAMS (SEQ ID NO: 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (SEQ ID NO: 45)	REWWGESWL FDY (SEQ ID NO: 76)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO: 54)	AASSLQ S (SEQ ID NO: 55)	QQSYST PLT (SEQ ID NO: 56)
Консенсусная последовательность	SYAMS (SEQ ID NO: 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (SEQ ID NO: 45)	REW$X_1X_2X_3X_4$ X_5X_6WX_7X_8DY, где X_1 отсутствует или V; X_2 отсутствует или P; X_3	RASQSISS YLN (SEQ ID NO: 54)	AASSLQ S (SEQ ID NO: 55)	QQSYST PLT (SEQ ID NO: 56)

			представляет собой W или Y; X_4 представляет собой G, Y или D; X_5 представляет собой E, D или V; X_6 представляет собой S или D; X_7 представляет собой L или Y; и X_8 представляет собой F или L (SEQ ID NO: 84)			

Таблица 5. CDR по Chothia иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из PALLAS

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SGSGGS (SEQ ID NO: 48)	REWVPYDVSWYFDY (SEQ ID NO: 46)	SQSISSY (SEQ ID NO: 57)	AAS (SEQ ID NO: 58)	YSTPL (SEQ ID NO: 59)
R1F2	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SGSGGS (SEQ ID NO: 48)	REWWYDDWYLDY (SEQ ID NO: 68)	SQSISSY (SEQ ID NO: 57)	AAS (SEQ ID NO: 58)	YSTPL (SEQ ID

						NO: 59)
R 1G5	G FTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SGSGG S (SEQ ID NO: 48)	REWWG ESWLFDY (SEQ ID NO: 76)	SQSI SSY (SEQ ID NO: 57)	A AS (SEQ ID NO: 58)	S YSTP L (SEQ ID NO: 59)
К онсенсус ная последов ательнос ть	G FTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SGSGG S (SEQ ID NO: 48)	REWX_1 $X_2X_3X_4X_5X_6$W X_7X_8DY, где X_1 отсутствует или представляет собой V; X_2 отсутствует или представляет собой P; X_3 представляет собой W или Y; X_4 представляет собой G, Y или D; X_5 представляет собой E, D или V; X_6 представляет собой S или D; X_7 представляет собой L или Y; и X_8 представляет собой F или L	SQSI SSY (SEQ ID NO: 57)	A AS (SEQ ID NO: 58)	S YSTP L (SEQ ID NO: 59)

			(SEQ ID NO: 84)			

Таблица 6. CDR по IMGT иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из PALLAS

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 49)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 50)	ARREWVPYDVSWYFDY (SEQ ID NO: 51)	QSISSY (SEQ ID NO: 60)	AAS (SEQ ID NO: 58)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 56)
R1F2	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 49)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 50)	ARREWWYDDWYLDY (SEQ ID NO: 69)	QSISSY (SEQ ID NO: 60)	AAS (SEQ ID NO: 58)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 56)
R1G5	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 49)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 50)	ARREWWGESWLFDY (SEQ ID NO: 77)	QSISSY (SEQ ID NO: 60)	AAS (SEQ ID NO: 58)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 56)
Консенсусная последовательность	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 49)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 50)	ARREW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6WX_7X_8$DY, где X_1 отсутствует или представляет собой V; X_2 отсутствует или представляет собой P; X_3 представляет собой W или Y; X_4 представляет собой G, Y или D; X_5 представляет собой E, D или V; X_6 представляет	QSISSY (SEQ ID NO: 60)	AAS (SEQ ID NO: 58)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 56)

			собой S или D; X_7 представляет собой L или Y; и X_8 представляет собой F или L (SEQ ID NO: 85)			

Таблица 7. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из B-клеток

SEQ ID NO	**Название/описание**	**Последовательность**
PI61		
SEQ ID NO: 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
SEQ ID NO: 87	HCDR2 (Kabat)	VISYDGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 89	HCDR2 (Chothia)	SYDGSN
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
SEQ ID NO: 91	HCDR2 (IMGT)	ISYDGSNK
SEQ ID NO: 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 93	VH	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA

		VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 94	ДНК VH	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGTCGTGCAGCCTGGAAGGAGCCTGAGACTCTCATGCGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTCCTCCTACGGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCCGGAAAGGGACTCGAATGGGTGGCTGTGATCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAAGGCCGGTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAATTCACTGCGCGCGGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGGTGGCTCCGGTTACGCCCTGCACGATGACTATTACGGCCTTGACCGTCTGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACTGTGTCCAGC
SEQ ID NO: 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
SEQ ID NO: 96	LCDR2 (Kabat)	DVSNRPS
SEQ ID NO: 97	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSTLYV
SEQ ID NO: 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY
SEQ ID NO: 99	LCDR2 (Chothia)	DVS
SEQ ID NO: 100	LCDR3 (Chothia)	YTSSSTLY
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
SEQ ID NO: 99	LCDR2 (IMGT)	DVS
SEQ ID NO: 97	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSTLYV
SEQ ID	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYN

NO: 102		YVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSS TLYVFGSGTKVTVL
SEQ ID NO: 103	ДНК VL	CAGAGCGCACTGACTCAGCCGGCATCCGTG TCCGGTAGCCCCGGACAGTCGATTACCATC TCCTGTACCGGCACCTCCTCCGACGTGGGA GGGTACAACTACGTGTCGTGGTACCAGCAG CACCCAGGAAAGGCCCCTAAGTTGATGATC TACGATGTGTCAAACCGCCCGTCTGGAGTC TCCAACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGC AACACCGCCAGCCTGACCATTAGCGGGCTG CAAGCCGAGGATGAGGCCGACTACTACTGC TCGAGCTACACATCCTCGAGCACCCTCTAC GTGTTCGGCTCGGGGACTAAGGTCACCGTG CTG
SEQ ID NO: 104	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 105	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPG QSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGSGTKVT VL
SEQ ID NO: 106	ДНК scFv	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGA GTCGTGCAGCCTGGAAGGAGCCTGAGACTC TCATGCGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTCCT CCTACGGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCC CCGGAAAGGGACTCGAATGGGTGGCTGTGA TCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTACTACG CCGACTCCGTGAAAGGCCGGTTCACTATCT CCCGGGACAACTCCAAGAACACGCTGTATC TGCAAATGAATTCACTGCGCGCGGAGGATA

		CCGCTGTGTACTACTGCGGTGGCTCCGGTTA CGCCCTGCACGATGACTATTACGGCCTTGA CGTCTGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACTGT GTCCAGCGGTGGAGGAGGTTCGGGCGGAGG AGGATCAGGAGGGGGTGGATCGCAGAGCG CACTGACTCAGCCGGCATCCGTGTCCGGTA GCCCCGGACAGTCGATTACCATCTCCTGTAC CGGCACCTCCTCCGACGTGGGAGGGTACAA CTACGTGTCGTGGTACCAGCAGCACCCAGG AAAGGCCCCTAAGTTGATGATCTACGATGT GTCAAACCGCCCGTCTGGAGTCTCCAACCG GTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGC CAGCCTGACCATTAGCGGGCTGCAAGCCGA GGATGAGGCCGACTACTACTGCTCGAGCTA CACATCCTCGAGCACCCTCTACGTGTTCGGC TCGGGGACTAAGGTCACCGTGCTG
SEQ ID NO: 107	Полная аминокислотная последовательность CAR	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPG QSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGSGTKVT VLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
SEQ ID NO: 108	Полная последовательность ДНК CAR	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGA GTCGTGCAGCCTGGAAGGAGCCTGAGACTC TCATGCGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTCCT

		CCTACGGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCC CCGGAAAGGGACTCGAATGGGTGGCTGTGA TCAGCTACGACGGCTCCAACAAGTACTACG CCGACTCCGTGAAAGGCCGGTTCACTATCT CCCGGGACAACTCCAAGAACACGCTGTATC TGCAAATGAATTCACTGCGCGCGGAGGATA CCGCTGTGTACTACTGCGGTGGCTCCGGTTA CGCCCTGCACGATGACTATTACGGCCTTGA CGTCTGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACTGT GTCCAGCGGTGGAGGAGGTTCGGGCGGAGG AGGATCAGGAGGGGGTGGATCGCAGAGCG CACTGACTCAGCCGGCATCCGTGTCCGGTA GCCCCGGACAGTCGATTACCATCTCCTGTAC CGGCACCTCCTCCGACGTGGGAGGGTACAA CTACGTGTCGTGGTACCAGCAGCACCCAGG AAAGGCCCCTAAGTTGATGATCTACGATGT GTCAAACCGCCCGTCTGGAGTCTCCAACCG GTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGC CAGCCTGACCATTAGCGGGCTGCAAGCCGA GGATGAGGCCGACTACTACTGCTCGAGCTA CACATCCTCGAGCACCCTCTACGTGTTCGGC TCGGGGACTAAGGTCACCGTGCTGACCACT ACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCT CCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGC GTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTG GGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCG CCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCTCTGGC TGGTACTTGCGGGGTCCTGCTGCTTTCACTC GTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGG AAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCC TTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAG GAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCAGAG GAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGT GAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGC CTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAA

		CGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTA CGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGG ACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGA AAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAG CTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTAT AGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAG AAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACC AGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCT ATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGC CTCGG
B61-02		
SEQ ID NO: 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
SEQ ID NO: 109	HCDR2 (Kabat)	VISYKGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 110	HCDR2 (Chothia)	SYKGSN
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
SEQ ID NO: 111	HCDR2 (IMGT)	ISYKGSNK
SEQ ID NO: 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 112	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVS S

SEQ ID NO: 113	ДНК VH	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTC TCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGA GCTACGGCATGCACTGGGTCAGACAAGCCC CAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTGTCA TCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACG CCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCT CCCGCGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATAC TGCAGTGTACTACTGCGGGGGTTCAGGCTA CGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGA CGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACCGT GTCCTCT
SEQ ID NO: 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
SEQ ID NO: 114	LCDR2 (Kabat)	EVSNRLR
SEQ ID NO: 115	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSALYV
SEQ ID NO: 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY
SEQ ID NO: 116	LCDR2 (Chothia)	EVS
SEQ ID NO: 117	LCDR3 (Chothia)	YTSSSALY
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
SEQ ID NO: 116	LCDR2 (IMGT)	EVS
SEQ ID NO: 115	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSALYV
SEQ ID NO: 118	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYN YVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRLRGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSS

		ALYVFGSGTKVTVL
SEQ ID NO: 119	ДНК VL	CAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTG AGCGGTTCGCCGGGACAGTCCATTACCATT TCGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGA GGCTACAACTACGTGTCCTGGTACCAGCAG CATCCCGGAAAGGCCCCGAAGCTGATGATC TACGAAGTGTCGAACAGACTGCGGGGAGTC TCCAACCGCTTTTCCGGGTCCAAGTCCGGCA ACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGGCTCC AGGCAGAAGATGAGGCTGACTATTACTGCT CCTCCTACACGTCAAGCTCCGCCCTCTACGT GTTCGGGTCCGGGACCAAAGTCACTGTGCT G
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 120	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASV SGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSALYVFGSGT KVTVL
SEQ ID NO: 121	ДНК scFv	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTC TCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGA GCTACGGCATGCACTGGGTCAGACAAGCCC CAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTGTCA TCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACG CCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCT CCCGCGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATAC TGCAGTGTACTACTGCGGGGGTTCAGGCTA CGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGA

		CGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACCGT GTCCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGG CGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGG AGGATCGCAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGC CTCCGTGAGCGGTTCGCCGGGACAGTCCAT TACCATTTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGAC GTGGGAGGCTACAACTACGTGTCCTGGTAC CAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCCGAAGCTG ATGATCTACGAAGTGTCGAACAGACTGCGG GGAGTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCCAAGT CCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCG GGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATT ACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCGCCCT CTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGTCAC TGTGCTG
SEQ ID NO: 122	Полная аминокислотная последовательность CAR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASV SGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSALYVFGSGT KVTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR
SEQ ID NO: 123	Полная последовательность ДНК CAR	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTC TCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGA GCTACGGCATGCACTGGGTCAGACAAGCCC

		CAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTGTCA TCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACG CCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCT CCCGCGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATAC TGCAGTGTACTACTGCGGGGGTTCAGGCTA CGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGA CGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACCGT GTCCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGG CGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGG AGGATCGCAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGC CTCCGTGAGCGGTTCGCCGGGACAGTCCAT TACCATTTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGAC GTGGGAGGCTACAACTACGTGTCCTGGTAC CAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCCGAAGCTG ATGATCTACGAAGTGTCGAACAGACTGCGG GGAGTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCCAAGT CCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCG GGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATT ACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCGCCCT CTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGTCAC TGTGCTGACCACTACCCCAGCACCGAGGCC ACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAG CCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGA CCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG GGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTT GGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCT GCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGT AAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATC TTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAG ACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGC CGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGC GAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCA GATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAAC CAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGG

		AGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG GAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGA AGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGC CTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATG GCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAA GGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGA CGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCAC CAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCA GGCCCTGCCGCCTCGG
B61-10		
SEQ ID NO: 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
SEQ ID NO: 109	HCDR2 (Kabat)	VISYKGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 110	HCDR2 (Chothia)	SYKGSN
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
SEQ ID NO: 111	HCDR2 (IMGT)	ISYKGSNK
SEQ ID NO: 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 112	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVS S
SEQ ID	ДНК VH	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGA

NO: 113		GTGGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTC TCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGA GCTACGGCATGCACTGGGTCAGACAAGCCC CAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTGTCA TCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACG CCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCT CCCGCGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATAC TGCAGTGTACTACTGCGGGGGTTCAGGCTA CGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGA CGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACCGT GTCCTCT
SEQ ID NO: 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
SEQ ID NO: 114	LCDR2 (Kabat)	EVSNRLR
SEQ ID NO: 97	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSTLYV
SEQ ID NO: 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY
SEQ ID NO: 116	LCDR2 (Chothia)	EVS
SEQ ID NO: 100	LCDR3 (Chothia)	YTSSSTLY
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
SEQ ID NO: 116	LCDR2 (IMGT)	EVS
SEQ ID NO: 97	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSTLYV
SEQ ID NO: 124	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYN YVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRLRGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSS TLYVFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 125	ДНК VL	CAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTG AGCGGTTCGCCGGGACAGTCCATTACCATT TCGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGA GGCTACAACTACGTGTCCTGGTACCAGCAG CATCCCGGAAAGGCCCCGAAGCTGATGATC TACGAAGTGTCGAACAGACTGCGGGGAGTC TCCAACCGCTTTTCCGGGTCCAAGTCCGGCA ACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGGCTCC AGGCAGAAGATGAGGCTGACTATTACTGCT CCTCCTACACGTCAAGCTCCACCCTCTACGT GTTCGGGTCCGGGACCAAAGTCACTGTGCT G
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 126	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASV SGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGSGT KVTVL
SEQ ID NO: 127	ДНК scFv	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTC TCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGA GCTACGGCATGCACTGGGTCAGACAAGCCC CAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTGTCA TCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACG CCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCT CCCGCGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATAC TGCAGTGTACTACTGCGGGGGTTCAGGCTA CGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGA CGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACCGT

		GTCCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGG CGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGG AGGATCGCAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGC CTCCGTGAGCGGTTCGCCGGGACAGTCCAT TACCATTTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGAC GTGGGAGGCTACAACTACGTGTCCTGGTAC CAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCCGAAGCTG ATGATCTACGAAGTGTCGAACAGACTGCGG GGAGTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCCAAGT CCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCG GGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATT ACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCACCCT CTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGTCAC TGTGCTG
SEQ ID NO: 128	Полная аминокислотная последовательность CAR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASV SGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYEVSNRLRGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGSGT KVTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR
SEQ ID NO: 129	Полная последовательность ДНК CAR	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTC TCATGTGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGA GCTACGGCATGCACTGGGTCAGACAAGCCC CAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTGTCA

		TCTCGTACAAGGGCTCAAACAAGTACTACG CCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCT CCCGCGATAACTCCAAGAATACCCTCTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGATAC TGCAGTGTACTACTGCGGGGGTTCAGGCTA CGCGCTGCACGACGACTACTACGGATTGGA CGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACCGT GTCCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGG CGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGG AGGATCGCAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGC CTCCGTGAGCGGTTCGCCGGGACAGTCCAT TACCATTTCGTGCACCGGGACCTCCTCCGAC GTGGGAGGCTACAACTACGTGTCCTGGTAC CAGCAGCATCCCGGAAAGGCCCCGAAGCTG ATGATCTACGAAGTGTCGAACAGACTGCGG GGAGTCTCCAACCGCTTTTCCGGGTCCAAGT CCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCG GGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGACTATT ACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCACCCT CTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGTCAC TGTGCTGACCACTACCCCAGCACCGAGGCC ACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAG CCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGA CCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG GGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTT GGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCT GCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGT AAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATC TTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAG ACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGC CGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGC GAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCA GATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAAC CAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGG AGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG

		GAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGA AGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGC CTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATG GCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAA GGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGA CGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCAC CAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCA GGCCCTGCCGCCTCGG

Таблица 8. CDR по Kabat иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из B-клеток

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	SYGMH (SEQ ID NO: 86)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 87)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 95)	DVSNRPS (SEQ ID NO: 96)	SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 97)
B61-02	SYGMH (SEQ ID NO: 86)	VISYKGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 109)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 95)	EVSNRLR (SEQ ID NO: 114)	SSYTSSSALYV (SEQ ID NO: 115)
B61-10	SYGMH (SEQ ID NO: 86)	VISYKGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 109)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 95)	EVSNRLR (SEQ ID NO: 114)	SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 97)
Консенсусная последовательность	SYGMH (SEQ ID NO: 86)	VISYXGSNKYYADSVKG, где X представляет собой D или K (SEQ ID NO: 130)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 95)	X_1VSNRX_2X_3, где X_1 представляет собой D или E; X_2 представляет собой P или L; и X_3 представляе	SSYTSSSXLYV, где X представляет собой T или A (SEQ ID NO: 132)

					т собой S или R (SEQ ID NO: 131)	

Таблица 9. CDR по Chothia иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из B-клеток

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SYDGSN (SEQ ID NO: 89)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TSSDVGGYNY (SEQ ID NO: 98)	DVS (SEQ ID NO: 99)	YTSSSTLY (SEQ ID NO: 100)
B61-02	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SYKGSN (SEQ ID NO: 110)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TSSDVGGYNY (SEQ ID NO: 98)	EVS (SEQ ID NO: 116)	YTSSSALY (SEQ ID NO: 117)
B61-10	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SYKGSN (SEQ ID NO: 110)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TSSDVGGYNY (SEQ ID NO: 98)	EVS (SEQ ID NO: 116)	YTSSSTLY (SEQ ID NO: 100)
Консенсусная последовательность	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SYXGSN, где X представляет собой D или K (SEQ ID NO: 133)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TSSDVGGYNY (SEQ ID NO: 98)	XVS, где X представляет собой D или E (SEQ ID NO: 134)	YTSSSXLY, где X представляет собой T или A

						(SEQ ID NO: 135)

Таблица 10. CDR по IMGT иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из B-клеток

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 90)	ISYDGSNK (SEQ ID NO: 91)	GGSGYA LHDDYY GLDV (SEQ ID NO: 92)	SSDVG GYNY (SEQ ID NO: 101)	DVS (SEQ ID NO: 99)	SSYTSSSTL YV (SEQ ID NO: 97)
B61-02	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 90)	ISYKGSNK (SEQ ID NO: 111)	GGSGYA LHDDYY GLDV (SEQ ID NO: 92)	SSDVG GYNY (SEQ ID NO: 101)	EVS (SEQ ID NO: 116)	SSYTSSSAL YV (SEQ ID NO: 115)
B61-10	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 90)	ISYKGSNK (SEQ ID NO: 111)	GGSGYA LHDDYY GLDV (SEQ ID NO: 92)	SSDVG GYNY (SEQ ID NO: 101)	EVS (SEQ ID NO: 116)	SSYTSSSTL YV (SEQ ID NO: 97)
Консенсусная последовательность	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 90)	ISYXGSNK, где X представляет собой D или K (SEQ ID NO: 136)	GGSGYA LHDDYY GLDV (SEQ ID NO: 92)	SSDVG GYNY (SEQ ID NO: 101)	XVS, где X представляет собой D или E (SEQ ID NO: 134)	SSYTSSSXL YV, где X представляет собой T или A (SEQ ID NO: 132)

Таблица 11. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, на основе PI61

Идентификация	**Последовательность белка**	**Последовательность ДНК (5'-3')**
Сигнальный пептид	MALPVTALLLPLALLLHAA RP (SEQ ID NO: 1)	Atggccctccctgtcaccgctctgttgctgccgcttg ctctgctgctccacgcagcgcgaccg (SEQ ID NO: 252)

VH PI61	QVQLQESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCGGSGYALHDDYYG LDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 93)	CAGGTACAATTGCAGGAGTCTG GAGGCGGTGTGGTGCAACCCGG TCGCAGCTTGCGCCTGAGTTGTG CTGCGTCTGGATTTACATTTTCA TCTTACGGAATGCATTGGGTACG CCAGGCACCGGGGAAAGGCCTT GAATGGGTGGCTGTAATTTCATA CGATGGTTCCAACAAATACTAT GCTGACTCAGTCAAGGGTCGAT TTACAATTAGTCGGGACAACTCC AAGAACACCCTTTATCTTCAAAT GAATTCCCTTAGAGCAGAGGAT ACGGCGGTCTATTACTGTGGTGG CAGTGGTTATGCACTTCATGATG ATTACTATGGCTTGGATGTCTGG GGGCAAGGGACGCTTGTAACTG TATCCTCT (SEQ ID NO: 260)
VL PI61	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGYNYVSWY QQHPGKAPKLMIYDVSNRP SGVSNRFSGSKSGNTASLTI SGLQAEDEADYYCSSYTSS STLYVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO: 102)	CAATCTGCTCTGACTCAACCAGC AAGCGTATCAGGGTCACCGGGA CAGAGTATTACCATAAGTTGCA CGGGGACCTCTAGCGATGTAGG GGGGTATAATTATGTATCTTGGT ATCAACAACACCCCGGGAAAGC CCCTAAATTGATGATCTACGACG TGAGCAATCGACCTAGTGGCGT ATCAAATCGCTTCTCTGGTAGCA AGAGTGGGAATACGGCGTCCCT TACTATTAGCGGATTGCAAGCA GAAGATGAGGCCGATTACTACT GCAGCTCCTATACTAGCTCTTCT ACATTGTACGTCTTTGGGAGCGG AACAAAAGTAACAGTACTC (SEQ ID NO: 261)
Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 104)	

ScFv PI61	QVQLQESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCGGSGYALHDDYYG LDVWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQSALTQPA SVSGSPGQSITISCTGTSSDV GGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFS GSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSYTSSSTLYVFG SGTKVTVL (SEQ ID NO: 105)	CaggtacaattgcaggagtctggaggcggtgtgGt gcaacccggtcgcagcttgcgcctgagttgtGctgc gtctggatttacattttcatcttacggaAtgcattgggt acgccaggcaccggggaaaggcCttgaatgggtg gctgtaatttcatacgatggtTccaacaaatactatgc tgactcagtcaagggtCgatttacaattagtcgggac aactccaagaacAccctttatcttcaaatgaattccct tagagcaGaggatacggcggtctattactgtggtgg cagtGgttatgcacttcatgatgattactatggcttgG atgtctgggggcaagggacgcttgtaactgtaTcct ctggtggtggtggtagtggtgggggaggcTccgg cggtggcggctctcaatctgctctgactCaaccagc aagcgtatcagggtcaccgggacagAgtattacca taagttgcacggggacctctagcGatgtaggggg tataattatgtatcttggtatCaacaacaccccgggaa agcccctaaattgatgAtctacgacgtgagcaatcg acctagtggcgtaTcaaatcgcttctctggtagcaag agtgggaatAcggcgtcccttactattagcggattg caagcaGaagatgaggccgattactactgcagctc ctatActagctcttctacattgtacgtctttgggagcg gaacaaaagtaacagtactc (SEQ ID NO: 253)
Трансмембранный домен и шарнирная область	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 202)	AcaacaacacctgccccgagaccgcctacaccaG ccccgactattgccagccagcctctgagcctcAgg cctgaggcctgtaggcccgcagcgggcggcGca gttcatacacggggcttggatttcgcttgtGatatttat atttgggctcctttggcggggacaTgtggcgtgctg cttctgtcacttgttattacactgtactgt (SEQ ID NO: 254)
4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL (SEQ ID NO: 7)	AaacgcgggcgaaaaaaattgctgtatatttttAag cagccatttatgaggcccgttcagacgacgCagga ggaggacggttgctcttgcaggttcccagaagagga agaaggggctgtgaattg (SEQ ID NO: 255)
CD3-дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQN	CgggttaaattttcaagatccgcagacgctccaGca

	QLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQA LPPR (SEQ ID NO: 10)	taccaacagggacaaaaccaactctataacGagct gaatcttggaagaagggaggaatatgatGtgctgg ataaacggcgcggtagagatccggagAtgggcgg aaaaccaaggcgaaaaaaccctcagGagggactc tacaacgaactgcagaaagacaaaAtggcggagg cttattccgaaataggcatgaagGgcgagcggagg cgagggaaagggcacgacggaCtgtatcaaggcc tctcaaccgcgactaaggatAcgtacgacgccctg cacatgcaggccctgcctccgaga (SEQ ID NO: 256)
Полная конструкция CAR PI61	MALPVTALLLPLALLLHAA RPQVQLQESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISY DGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCGGSGYALHDDYY GLDVWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSYTSSSTLYVFG SGTKVTVLTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDG	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCTCT GTTGCTGCCGCTTGCTCTGCTGC TCCACGCAGCGCGACCGCAGGT ACAATTGCAGGAGTCTGGAGGC GGTGTGGTGCAACCCGGTCGCA GCTTGCGCCTGAGTTGTGCTGCG TCTGGATTTACATTTTCATCTTA CGGAATGCATTGGGTACGCCAG GCACCGGGGAAAGGCCTTGAAT GGGTGGCTGTAATTTCATACGAT GGTTCCAACAAATACTATGCTG ACTCAGTCAAGGGTCGATTTAC AATTAGTCGGGACAACTCCAAG AACACCCTTTATCTTCAAATGAA TTCCCTTAGAGCAGAGGATACG GCGGTCTATTACTGTGGTGGCAG TGGTTATGCACTTCATGATGATT ACTATGGCTTGGATGTCTGGGG GCAAGGGACGCTTGTAACTGTA TCCTCTGGTGGTGGTGGTAGTGG TGGGGGAGGCTCCGGCGGTGGC GGCTCTCAATCTGCTCTGACTCA ACCAGCAAGCGTATCAGGGTCA CCGGGACAGAGTATTACCATAA GTTGCACGGGGACCTCTAGCGA

	LYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR (SEQ ID NO: 257)	TGTAGGGGGGTATAATTATGTAT CTTGGTATCAACAACACCCCGG GAAAGCCCCTAAATTGATGATC TACGACGTGAGCAATCGACCTA GTGGCGTATCAAATCGCTTCTCT GGTAGCAAGAGTGGGAATACGG CGTCCCTTACTATTAGCGGATTG CAAGCAGAAGATGAGGCCGATT ACTACTGCAGCTCCTATACTAGC TCTTCTACATTGTACGTCTTTGG GAGCGGAACAAAAGTAACAGTA CTCACAACAACACCTGCCCCGA GACCGCCTACACCAGCCCCGAC TATTGCCAGCCAGCCTCTGAGCC TCAGGCCTGAGGCCTGTAGGCC CGCAGCGGGCGGCGCAGTTCAT ACACGGGGCTTGGATTTCGCTTG TGATATTTATATTTGGGCTCCTT TGGCGGGGACATGTGGCGTGCT GCTTCTGTCACTTGTTATTACAC TGTACTGTAAACGCGGGCGAAA AAAATTGCTGTATATTTTTAAGC AGCCATTTATGAGGCCCGTTCAG ACGACGCAGGAGGAGGACGGTT GCTCTTGCAGGTTCCCAGAAGA GGAAGAAGGGGGCTGTGAATTG CGGGTTAAATTTTCAAGATCCGC AGACGCTCCAGCATACCAACAG GGACAAAACCAACTCTATAACG AGCTGAATCTTGGAAGAAGGGA GGAATATGATGTGCTGGATAAA CGGCGCGGTAGAGATCCGGAGA TGGGCGGAAAACCAAGGCGAAA AAACCCTCAGGAGGGACTCTAC AACGAACTGCAGAAAGACAAAA

		TGGCGGAGGCTTATTCCGAAAT AGGCATGAAGGGCGAGCGGAGG CGAGGGAAAGGGCACGACGGAC TGTATCAAGGCCTCTCAACCGCG ACTAAGGATACGTACGACGCCC TGCACATGCAGGCCCTGCCTCCG AGA (SEQ ID NO: 258)
Полная конструкция CAR PI61 (нуклеиновая кислота с сигнальным пептидом и стоп-кодонами)		ATGGCCCTCCCTGTCACCGCTCT GTTGCTGCCGCTTGCTCTGCTGC TCCACGCAGCGCGACCGCAGGT ACAATTGCAGGAGTCTGGAGGC GGTGTGGTGCAACCCGGTCGCA GCTTGCGCCTGAGTTGTGCTGCG TCTGGATTTACATTTTCATCTTA CGGAATGCATTGGGTACGCCAG GCACCGGGGAAAGGCCTTGAAT GGGTGGCTGTAATTTCATACGAT GGTTCCAACAAATACTATGCTG ACTCAGTCAAGGGTCGATTTAC AATTAGTCGGGACAACTCCAAG AACACCCTTTATCTTCAAATGAA TTCCCTTAGAGCAGAGGATACG GCGGTCTATTACTGTGGTGGCAG TGGTTATGCACTTCATGATGATT ACTATGGCTTGGATGTCTGGGG GCAAGGGACGCTTGTAACTGTA TCCTCTGGTGGTGGTGGTAGTGG TGGGGGAGGCTCCGGCGGTGGC GGCTCTCAATCTGCTCTGACTCA ACCAGCAAGCGTATCAGGGTCA CCGGGACAGAGTATTACCATAA GTTGCACGGGGACCTCTAGCGA TGTAGGGGGGTATAATTATGTAT CTTGGTATCAACAACACCCCGG GAAAGCCCCTAAATTGATGATC

		TACGACGTGAGCAATCGACCTA GTGGCGTATCAAATCGCTTCTCT GGTAGCAAGAGTGGGAATACGG CGTCCCTTACTATTAGCGGATTG CAAGCAGAAGATGAGGCCGATT ACTACTGCAGCTCCTATACTAGC TCTTCTACATTGTACGTCTTTGG GAGCGGAACAAAAGTAACAGTA CTCACAACAACACCTGCCCCGA GACCGCCTACACCAGCCCCGAC TATTGCCAGCCAGCCTCTGAGCC TCAGGCCTGAGGCCTGTAGGCC CGCAGCGGGCGGCGCAGTTCAT ACACGGGGCTTGGATTTCGCTTG TGATATTTATATTTGGGCTCCTT TGGCGGGGACATGTGGCGTGCT GCTTCTGTCACTTGTTATTACAC TGTACTGTAAACGCGGGCGAAA AAAATTGCTGTATATTTTTAAGC AGCCATTTATGAGGCCCGTTCAG ACGACGCAGGAGGAGGACGGTT GCTCTTGCAGGTTCCCAGAAGA GGAAGAAGGGGGCTGTGAATTG CGGGTTAAATTTTCAAGATCCGC AGACGCTCCAGCATACCAACAG GGACAAAACCAACTCTATAACG AGCTGAATCTTGGAAGAAGGGA GGAATATGATGTGCTGGATAAA CGGCGCGGTAGAGATCCGGAGA TGGGCGGAAAACCAAGGCGAAA AAACCCTCAGGAGGGACTCTAC AACGAACTGCAGAAAGACAAAA TGGCGGAGGCTTATTCCGAAAT AGGCATGAAGGGCGAGCGGAGG CGAGGGAAAGGGCACGACGGAC

		TGTATCAAGGCCTCTCAACCGCG ACTAAGGATACGTACGACGCCC TGCACATGCAGGCCCTGCCTCCG AGATGATAA (SEQ ID NO: 416)
Зрелый белок CAR PI61	QVQLQESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCGGSGYALHDDYYG LDVWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQSALTQPA SVSGSPGQSITISCTGTSSDV GGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFS GSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSYTSSSTLYVFG SGTKVTVLTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR (SEQ ID NO: 107)	caggtacaattgcaggagtctggaggcggtgtggtg caacccggtcgcagcttgcgcctgagttgtgctgcgt ctggatttacattttcatcttacggaatgcattgggtac gccaggcaccggggaaaggccttgaatgggtggct gtaatttcatacgatggttccaacaaatactatgctga ctcagtcaagggtcgatttacaattagtcgggacaac tccaagaacaccctttatcttcaaatgaattcccttaga gcagaggatacggcggtctattactgtggtggcagt ggttatgcacttcatgatgattactatggcttggatgtc tgggggcaagggacgcttgtaactgtatcctctggtg gtggtggtagtggtgggggaggctccggcggtggc ggctctcaatctgctctgactcaaccagcaagcgtat cagggtcaccgggacagagtattaccataagttgca cggggacctctagcgatgtaggggggtataattatgt atcttggtatcaacaacaccccgggaaagcccctaa attgatgatctacgacgtgagcaatcgacctagtggc gtatcaaatcgcttctctggtagcaagagtgggaata cggcgtcccttactattagcggattgcaagcagaag atgaggccgattactactgcagctcctatactagctct tctacattgtacgtctttgggagcggaacaaaagtaa cagtactcacaacaacacctgccccgagaccgccta caccagccccgactattgccagccagcctctgagcc tcaggcctgaggcctgtaggcccgcagcgggcgg cgcagttcatacacggggcttggatttcgcttgtgata tttatatttgggctcctttggcggggacatgtggcgtg ctgcttctgtcacttgttattacactgtactgtaaacgc gggcgaaaaaaattgctgtatatttttaagcagccattt atgaggcccgttcagacgacgcaggaggaggacg gttgctcttgcaggttcccagaagaggaagaaggggg gctgtgaattgcgggttaaattttcaagatccgcagac gctccagcataccaacagggacaaaaccaactctat

		aacgagctgaatcttggaagaagggaggaatatgat gtgctggataaacggcgcggtagagatccggagat gggcggaaaaccaaggcgaaaaaaccctcaggag ggactctacaacgaactgcagaaagacaaaatggc ggaggcttattccgaaataggcatgaagggcgagc ggaggcgagggaaagggcacgacggactgtatca aggcctctcaaccgcgactaaggatacgtacgacg ccctgcacatgcaggccctgcctccgaga (SEQ ID NO: 259)

Таблица 12. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из гибридомы

SEQ ID NO	**Название/описание**	**Последовательность**
Hy03		
SEQ ID NO: 137	HCDR1 (Kabat)	GFWMS
SEQ ID NO: 138	HCDR2 (Kabat)	NIKQDGSEKYYVDSVRG
SEQ ID NO: 139	HCDR3 (Kabat)	ALDYYGMDV
SEQ ID NO: 140	HCDR1 (Chothia)	GFTFSGF
SEQ ID NO: 141	HCDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO: 139	HCDR3 (Chothia)	ALDYYGMDV
SEQ ID NO: 142	HCDR1 (IMGT)	GFTFSGFW
SEQ ID NO: 143	HCDR2 (IMGT)	IKQDGSEK
SEQ ID NO: 144	HCDR3 (IMGT)	ARALDYYGMDV
SEQ ID NO: 145	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSGFWMSWVRQAPGKGLEW VANIKQDGSEKYYVDSVRGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARALDYYGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 146	ДНК VH	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGG TGGAGGGCTTGTCCAGCCCGGAG GATCGCTGCGGCTGTCCTGTGCTG CGTCCGGGTTCACCTTCTCCGGCT TCTGGATGTCCTGGGTCAGACAG GCACCGGGAAAGGGCCTCGAATG GGTGGCCAACATCAAGCAGGATG

		GCTCCGAGAAGTACTACGTCGAC TCCGTGAGAGGCCGCTTCACCAT CTCCCGGGACAACGCCAAGAACT CGCTGTACCTCCAAATGAATAGC CTCAGGGCGGAAGATACTGCTGT GTATTACTGCGCACGCGCCCTTGA CTACTACGGCATGGACGTCTGGG GCCAAGGGACCACTGTGACCGTG TCTAGC
SEQ ID NO: 147	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLDSDDGNTYLD
SEQ ID NO: 148	LCDR2 (Kabat)	TLSYRAS
SEQ ID NO: 149	LCDR3 (Kabat)	TQRLEFPSIT
SEQ ID NO: 150	LCDR1 (Chothia)	SQSLLDSDDGNTY
SEQ ID NO: 151	LCDR2 (Chothia)	TLS
SEQ ID NO: 152	LCDR3 (Chothia)	RLEFPSI
SEQ ID NO: 153	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDDGNTY
SEQ ID NO: 151	LCDR2 (IMGT)	TLS
SEQ ID NO: 149	LCDR3 (IMGT)	TQRLEFPSIT
SEQ ID NO: 154	VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSS QSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSP RLLIYTLSYRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGLYYCTQRLEF PSITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 155	ДНК VL	GATATCGTGATGACCCAGACTCC CCTGTCCCTGCCTGTGACTCCCGG AGAACCAGCCTCCATTTCCTGCCG GTCCTCCCAGTCCCTGCTGGACAG CGACGACGGCAACACTTACCTGG ACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGC CAATCGCCTCGCCTGCTGATCTAT ACCCTGTCATACCGGGCCTCAGG AGTGCCTGACCGCTTCTCGGGATC AGGGAGCGGGACCGATTTCACCC TGAAAATTTCCCGAGTGGAAGCC

		GAGGACGTCGGACTGTACTACTG CACCCAGCGCCTCGAATTCCCGTC GATTACGTTTGGACAGGGTACCC GGCTTGAGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 156	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSGFWMSWVRQAPGKGLEW VANIKQDGSEKYYVDSVRGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARALDYYGMDVWGQGTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIV MTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSL LDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPRLL IYTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGLYYCTQRLEFPSI TFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 157	ДНК scFv	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGG TGGAGGGCTTGTCCAGCCCGGAG GATCGCTGCGGCTGTCCTGTGCTG CGTCCGGGTTCACCTTCTCCGGCT TCTGGATGTCCTGGGTCAGACAG GCACCGGGAAAGGGCCTCGAATG GGTGGCCAACATCAAGCAGGATG GCTCCGAGAAGTACTACGTCGAC TCCGTGAGAGGCCGCTTCACCAT CTCCCGGGACAACGCCAAGAACT CGCTGTACCTCCAAATGAATAGC CTCAGGGCGGAAGATACTGCTGT GTATTACTGCGCACGCGCCCTTGA CTACTACGGCATGGACGTCTGGG GCCAAGGGACCACTGTGACCGTG TCTAGCGGAGGCGGAGGTTCAGG GGGCGGTGGATCAGGCGGAGGAG GATCGGGGGGTGGTGGATCGGAT ATCGTGATGACCCAGACTCCCCT

		GTCCCTGCCTGTGACTCCCGGAG AACCAGCCTCCATTTCCTGCCGGT CCTCCCAGTCCCTGCTGGACAGC GACGACGGCAACACTTACCTGGA CTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCC AATCGCCTCGCCTGCTGATCTATA CCCTGTCATACCGGGCCTCAGGA GTGCCTGACCGCTTCTCGGGATCA GGGAGCGGGACCGATTTCACCCT GAAAATTTCCCGAGTGGAAGCCG AGGACGTCGGACTGTACTACTGC ACCCAGCGCCTCGAATTCCCGTC GATTACGTTTGGACAGGGTACCC GGCTTGAGATCAAG
SEQ ID NO: 158	Полная аминокислотная последовательность CAR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSGFWMSWVRQAPGKGLEW VANIKQDGSEKYYVDSVRGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARALDYYGMDVWGQGTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIV MTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSL LDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPRLL IYTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGLYYCTQRLEFPSI TFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 159	Полная последовательность	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGG

	ДНК CAR	TGGAGGGCTTGTCCAGCCCGGAG GATCGCTGCGGCTGTCCTGTGCTG CGTCCGGGTTCACCTTCTCCGGCT TCTGGATGTCCTGGGTCAGACAG GCACCGGGAAAGGGCCTCGAATG GGTGGCCAACATCAAGCAGGATG GCTCCGAGAAGTACTACGTCGAC TCCGTGAGAGGCCGCTTCACCAT CTCCCGGGACAACGCCAAGAACT CGCTGTACCTCCAAATGAATAGC CTCAGGGCGGAAGATACTGCTGT GTATTACTGCGCACGCGCCCTTGA CTACTACGGCATGGACGTCTGGG GCCAAGGGACCACTGTGACCGTG TCTAGCGGAGGCGGAGGTTCAGG GGGCGGTGGATCAGGCGGAGGAG GATCGGGGGGTGGTGGATCGGAT ATCGTGATGACCCAGACTCCCCT GTCCCTGCCTGTGACTCCCGGAG AACCAGCCTCCATTTCCTGCCGGT CCTCCCAGTCCCTGCTGGACAGC GACGACGGCAACACTTACCTGGA CTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCC AATCGCCTCGCCTGCTGATCTATA CCCTGTCATACCGGGCCTCAGGA GTGCCTGACCGCTTCTCGGGATCA GGGAGCGGGACCGATTTCACCCT GAAAATTTCCCGAGTGGAAGCCG AGGACGTCGGACTGTACTACTGC ACCCAGCGCCTCGAATTCCCGTC GATTACGTTTGGACAGGGTACCC GGCTTGAGATCAAGACCACTACC CCAGCACCGAGGCCACCCACCCC GGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCC TCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATG

		TAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCG TGCATACCCGGGGTCTTGACTTCG CCTGCGATATCTACATTTGGGCCC CTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCC TGCTGCTTTCACTCGTGATCACTC TTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAG AAGCTGCTGTACATCTTTAAGCA ACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGA CTACTCAAGAGGAGGACGGCTGT TCATGCCGGTTCCCAGAGGAGGA GGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCG TGAAATTCAGCCGCAGCGCAGAT GCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCA GAACCAGCTCTACAACGAACTCA ATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGCGGAGAGG ACGGGACCCAGAAATGGGCGGGA AGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAA GAGGGCCTGTACAACGAGCTCCA AAAGGATAAGATGGCAGAAGCCT ATAGCGAGATTGGTATGAAAGGG GAACGCAGAAGAGGCAAAGGCC ACGACGGACTGTACCAGGGACTC AGCACCGCCACCAAGGACACCTA TGACGCTCTTCACATGCAGGCCCT GCCGCCTCGG
Hy52		
SEQ ID NO: 160	HCDR1 (Kabat)	SFRMN
SEQ ID NO: 161	HCDR2 (Kabat)	SISSSSSYIYYADSVKG
SEQ ID NO: 162	HCDR3 (Kabat)	WLSYYGMDV
SEQ ID NO: 163	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSF
SEQ ID NO: 164	HCDR2 (Chothia)	SSSSSY
SEQ ID NO: 162	HCDR3 (Chothia)	WLSYYGMDV
SEQ ID NO: 165	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSFR

SEQ ID NO: 166	HCDR2 (IMGT)	ISSSSSYI
SEQ ID NO: 167	HCDR3 (IMGT)	ARWLSYYGMDV
SEQ ID NO: 168	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSFRMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWLSYYGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 169	ДНК VH	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGG TGGAGGGCTTGTCAAGCCCGGAG GATCGCTGCGGCTGTCCTGTGCTG CGTCCGGGTTCACCTTCTCCTCGT TCCGCATGAACTGGGTCAGACAG GCACCGGGAAAGGGCCTCGAATG GGTGTCCTCAATCTCATCGTCCTC GTCCTACATCTACTACGCCGACTC CGTGAAAGGCCGCTTCACCATCT CCCGGGACAACGCCAAGAACTCG CTGTACCTCCAAATGAATAGCCTC AGGGCGGAAGATACTGCTGTGTA TTACTGCGCACGCTGGCTTTCCTA CTACGGCATGGACGTCTGGGGCC AAGGGACCACTGTGACCGTGTCT AGC
SEQ ID NO: 147	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLDSDDGNTYLD
SEQ ID NO: 170	LCDR2 (Kabat)	TLSFRAS
SEQ ID NO: 171	LCDR3 (Kabat)	MQRIGFPIT
SEQ ID NO: 150	LCDR1 (Chothia)	SQSLLDSDDGNTY
SEQ ID NO: 151	LCDR2 (Chothia)	TLS
SEQ ID NO: 172	LCDR3 (Chothia)	RIGFPI
SEQ ID NO: 153	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDDGNTY
SEQ ID NO: 151	LCDR2 (IMGT)	TLS
SEQ ID NO: 171	LCDR3 (IMGT)	MQRIGFPIT
SEQ ID NO: 173	VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSS QSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSP

		QLLIYTLSFRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKIRRVEAEDVGVYYCMQRIG FPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 174	ДНК VL	GATATCGTGATGACCCAGACTCC CCTGTCCCTGCCTGTGACTCCCGG AGAACCAGCCTCCATTTCCTGCCG GTCCTCCCAGTCCCTGCTGGACAG CGACGACGGCAACACTTACCTGG ACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGC CAATCGCCTCAGCTGCTGATCTAT ACCCTGTCATTCCGGGCCTCAGG AGTGCCTGACCGCTTCTCGGGATC AGGGAGCGGGACCGATTTCACCC TGAAAATTAGGCGAGTGGAAGCC GAGGACGTCGGAGTGTACTACTG CATGCAGCGCATCGGCTTCCCGA TTACGTTTGGACAGGGTACCCGG CTTGAGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 175	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSFRMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWLSYYGMDVWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVM TQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLL DSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLI YTLSFRASGVPDRFSGSGSGTDFTL KIRRVEAEDVGVYYCMQRIGFPITF GQGTRLEIK
SEQ ID NO: 176	ДНК scFv	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGG TGGAGGGCTTGTCAAGCCCGGAG GATCGCTGCGGCTGTCCTGTGCTG CGTCCGGGTTCACCTTCTCCTCGT TCCGCATGAACTGGGTCAGACAG

		GCACCGGGAAAGGGCCTCGAATG GGTGTCCTCAATCTCATCGTCCTC GTCCTACATCTACTACGCCGACTC CGTGAAAGGCCGCTTCACCATCT CCCGGGACAACGCCAAGAACTCG CTGTACCTCCAAATGAATAGCCTC AGGGCGGAAGATACTGCTGTGTA TTACTGCGCACGCTGGCTTTCCTA CTACGGCATGGACGTCTGGGGCC AAGGGACCACTGTGACCGTGTCT AGCGGAGGCGGAGGTTCAGGGGG CGGTGGATCAGGCGGAGGAGGAT CGGGGGGTGGTGGATCGGATATC GTGATGACCCAGACTCCCCTGTCC CTGCCTGTGACTCCCGGAGAACC AGCCTCCATTTCCTGCCGGTCCTC CCAGTCCCTGCTGGACAGCGACG ACGGCAACACTTACCTGGACTGG TACTTGCAGAAGCCGGGCCAATC GCCTCAGCTGCTGATCTATACCCT GTCATTCCGGGCCTCAGGAGTGC CTGACCGCTTCTCGGGATCAGGG AGCGGGACCGATTTCACCCTGAA AATTAGGCGAGTGGAAGCCGAGG ACGTCGGAGTGTACTACTGCATG CAGCGCATCGGCTTCCCGATTAC GTTTGGACAGGGTACCCGGCTTG AGATCAAG
SEQ ID NO: 177	Полная аминокислотная последовательность CAR	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSFRMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWLSYYGMDVWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVM TQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLL

		DSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLI YTLSFRASGVPDRFSGSGSGTDFTL KIRRVEAEDVGVYYCMQRIGFPITF GQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 178	Полная последовательность ДНК CAR	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGG TGGAGGGCTTGTCAAGCCCGGAG GATCGCTGCGGCTGTCCTGTGCTG CGTCCGGGTTCACCTTCTCCTCGT TCCGCATGAACTGGGTCAGACAG GCACCGGGAAAGGGCCTCGAATG GGTGTCCTCAATCTCATCGTCCTC GTCCTACATCTACTACGCCGACTC CGTGAAAGGCCGCTTCACCATCT CCCGGGACAACGCCAAGAACTCG CTGTACCTCCAAATGAATAGCCTC AGGGCGGAAGATACTGCTGTGTA TTACTGCGCACGCTGGCTTTCCTA CTACGGCATGGACGTCTGGGGCC AAGGGACCACTGTGACCGTGTCT AGCGGAGGCGGAGGTTCAGGGGG CGGTGGATCAGGCGGAGGAGGAT CGGGGGGTGGTGGATCGGATATC GTGATGACCCAGACTCCCCTGTCC CTGCCTGTGACTCCCGGAGAACC AGCCTCCATTTCCTGCCGGTCCTC CCAGTCCCTGCTGGACAGCGACG

		ACGGCAACACTTACCTGGACTGG TACTTGCAGAAGCCGGGCCAATC GCCTCAGCTGCTGATCTATACCCT GTCATTCCGGGCCTCAGGAGTGC CTGACCGCTTCTCGGGATCAGGG AGCGGGACCGATTTCACCCTGAA AATTAGGCGAGTGGAAGCCGAGG ACGTCGGAGTGTACTACTGCATG CAGCGCATCGGCTTCCCGATTAC GTTTGGACAGGGTACCCGGCTTG AGATCAAGACCACTACCCCAGCA CCGAGGCCACCCACCCCGGCTCC TACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTC CCTGCGTCCGGAGGCATGTAGAC CCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCAT ACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGC GATATCTACATTTGGGCCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGGTCCTGCTG CTTTCACTCGTGATCACTCTTTAC TGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCT GCTGTACATCTTTAAGCAACCCTT CATGAGGCCTGTGCAGACTACTC AAGAGGAGGACGGCTGTTCATGC CGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGG CGGCTGCGAACTGCGCGTGAAAT TCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCA GCCTACCAGCAGGGGCAGAACCA GCTCTACAACGAACTCAATCTTG GTCGGAGAGAGGAGTACGACGTG CTGGACAAGCGGAGAGGACGGG ACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCG CGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGG CCTGTACAACGAGCTCCAAAAGG ATAAGATGGCAGAAGCCTATAGC GAGATTGGTATGAAAGGGGAACG

		CAGAAGAGGCAAAGGCCACGAC GGACTGTACCAGGGACTCAGCAC CGCCACCAAGGACACCTATGACG CTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGC CTCGG

Таблица 13. CDR по Kabat иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из гибридомы

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFWMS (SEQ ID NO: 137)	NIKQDGSEKYYVDSVRG (SEQ ID NO: 138)	ALDYYGMDV (SEQ ID NO: 139)	RSSQSLLDSDDGNTYLD (SEQ ID NO: 147)	TLSYRAS (SEQ ID NO: 148)	TQRLEFPSIT (SEQ ID NO: 149)
Hy52	SFRMN (SEQ ID NO: 160)	SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 161)	WLSYYGMDV (SEQ ID NO: 162)	RSSQSLLDSDDGNTYLD (SEQ ID NO: 147)	TLSFRAS (SEQ ID NO: 170)	MQRIGFPIT (SEQ ID NO: 171)
Консенсусная последовательность	$X_1FX_2MX_3$, где X_1 представляет собой G или S; X_2 представляет собой W или R; и X_3 представляет собой S или N (SEQ ID NO: 179)	$X_1IX_2X_3X_4X_5SX_6X_7YYX_8DSVX_9G$, где X_1 представляет собой N или S; X_2 представляет собой K или S; X_3 представляет собой Q или S;	$X_1LX_2YYGMDV$, где X_1 представляет собой A или W; и X_2 представляет собой D или S (SEQ ID NO: 181)	RSSQSLLDSDDGNTYLD (SEQ ID NO: 147)	TLSXRAS, где X представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 182)	$X_1QRX_2X_3FPX_4IT$, где X_1 представляет собой T или M; X_2 представляет собой L или I; X_3 представляет собой E или G; и X_4 представляет собой S или отсутствует (SEQ ID NO: 183)

		X_4 представляет собой D или S; X_5 представляет собой G или S; X_6 представляет собой E или Y; X_7 представляет собой K или I; X_8 представляет собой V или A; и X_9 представляет собой R или K (SEQ ID NO: 180)				

Таблица 14. CDR по Chothia иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из гибридомы

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFTFSGF (SEQ ID NO: 140)	KQDGSE (SEQ ID NO: 141)	ALDYYGMDV (SEQ ID NO: 139)	SQSLLDSDDGNTY (SEQ ID NO: 150)	TLS (SEQ ID NO: 151)	RLEFPSI (SEQ ID NO: 152)
Hy52	GFTFSSF (SEQ ID NO:	SSSSSY (SEQ ID	WLSYYGMDV (SEQ ID	SQSLLDSDDGNTY	TLS (SEQ	RIGFPI (SEQ ID NO: 172)

	163)	NO: 164)	NO: 162)	(SEQ ID NO: 150)	ID NO: 151)	
Консенсусная последовательность	GFTFSXF, где X представляет собой G или S (SEQ ID NO: 184)	$X_1X_2X_3X_4SX_5$, где X_1 представляет собой K или S; X_2 представляет собой Q или S; X_3 представляет собой D или S; X_4 представляет собой G или S; и X_5 представляет собой E или Y (SEQ ID NO: 185)	$X_1LX_2YYGMDV$, где X_1 представляет собой A или W; и X_2 представляет собой D или S (SEQ ID NO: 181)	SQSLLDSDDGNTY (SEQ ID NO: 150)	TLS (SEQ ID NO: 151)	$RX_1X_2FPX_3I$, где X_1 представляет собой L или I; X_2 представляет собой E или G; и X_3 представляет собой S или отсутствует (SEQ ID NO: 186)

Таблица 15. CDR по IMGT иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из гибридомы

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFTFSGF	IKQDGSEK	ARALDYY	QSLLDS	TLS	TQRLEFPSI

	W (SEQ ID NO: 142)	(SEQ ID NO: 143)	GMDV (SEQ ID NO: 144)	DDGNTY (SEQ ID NO: 153)	(SEQ ID NO: 151)	T (SEQ ID NO: 149)
Hy52	GFTFSSFR (SEQ ID NO: 165)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 166)	ARWLSYYGMDV (SEQ ID NO: 167)	QSLLDSDDGNTY (SEQ ID NO: 153)	TLS (SEQ ID NO: 151)	MQRIGFPIT (SEQ ID NO: 171)
Консенсусная последовательность	GFTFSX$_1$FX$_2$, где X$_1$ представляет собой G или S; и X$_2$ представляет собой W или R (SEQ ID NO: 187)	IX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$SX$_5$X$_6$, где X$_1$ представляет собой K или S; X$_2$ представляет собой Q или S; X$_3$ представляет собой D или S; X$_4$ представляет собой G или S; X$_5$ представляет собой E или Y; и X$_6$ представляет собой K или I (SEQ ID NO: 188)	ARX$_1$LX$_2$YYGMDV, где X$_1$ представляет собой A или W; и X$_2$ представляет собой D или S (SEQ ID NO: 189)	QSLLDSDDGNTY (SEQ ID NO: 153)	TLS (SEQ ID NO: 151)	X$_1$QRX$_2$X$_3$FPX$_4$IT, где X$_1$ представляет собой T или M; X$_2$ представляет собой L или I; X$_3$ представляет собой E или G; и X$_4$ представляет собой S или отсутствует (SEQ ID NO: 183)

В некоторых вариантах осуществления человеческий домен, связывающий BCMA, содержит CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC.

В определенных вариантах осуществления молекула CAR, описанная в данном документе, или домен, связывающий BCMA, описанный в данном документе, содержат:

(1) одну, две или три CDR легкой цепи (LC), выбранные из:

(i) CDR1 LC под SEQ ID NO: 54, CDR2 LC под SEQ ID NO: 55 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 56; и/или

(2) одну, две или три CDR тяжелой цепи (HC) из любой из следующих:

(i) CDR1 HC под SEQ ID NO: 44, CDR2 HC под SEQ ID NO: 45 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 84; (ii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 44, CDR2 HC под SEQ ID NO: 45 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 46; (iii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 44, CDR2 HC под SEQ ID NO: 45 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 68 или (iv) CDR1 HC под SEQ ID NO: 44, CDR2 HC под SEQ ID NO: 45 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 76.

В определенных вариантах осуществления молекула CAR, описанная в данном документе, или домен, связывающий BCMA, описанный в данном документе, содержат:

(1) одну, две или три CDR легкой цепи (LC) из любой из следующих:

(i) CDR1 LC под SEQ ID NO: 95, CDR2 LC под SEQ ID NO: 131 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 132; (ii) CDR1 LC под SEQ ID NO: 95, CDR2 LC под SEQ ID NO: 96 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 97; (iii) CDR1 LC под SEQ ID NO: 95, CDR2 LC под SEQ ID NO: 114 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 115 или (iv) CDR1 LC под SEQ ID NO: 95, CDR2 LC под SEQ ID NO: 114 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 97; и/или

(2) одну, две или три CDR тяжелой цепи (HC) из любой из следующих:

(i) CDR1 HC под SEQ ID NO: 86, CDR2 HC под SEQ ID NO: 130 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 88; (ii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 86, CDR2 HC под SEQ ID NO: 87 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 88 или (iii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 86, CDR2 HC под SEQ ID NO: 109 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 88.

В определенных вариантах осуществления молекула CAR, описанная в данном документе, или домен, связывающий BCMA, описанный в данном документе, содержат:

(1) одну, две или три CDR легкой цепи (LC) из любой из следующих:

(i) CDR1 LC под SEQ ID NO: 147, CDR2 LC под SEQ ID NO: 182 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 183; (ii) CDR1 LC под SEQ ID NO: 147, CDR2 LC под SEQ ID NO: 148 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 149 или (iii) CDR1 LC под SEQ ID NO: 147, CDR2 LC под SEQ ID NO: 170 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 171; и/или

(2) одну, две или три CDR тяжелой цепи (HC) из любой из следующих:

(i) CDR1 HC под SEQ ID NO: 179, CDR2 HC под SEQ ID NO: 180 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 181; (ii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 137, CDR2 HC под SEQ ID NO: 138 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 139 или (iii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 160, CDR2 HC под SEQ ID NO: 161 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 162.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44, 45, 84, 54, 55 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44, 45, 46, 54, 55 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44, 45, 68, 54, 55 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44, 45, 76, 54, 55 и 56 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47, 48, 84, 57, 58 и 59 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47, 48, 46, 57, 58 и 59 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47, 48, 68, 57, 58 и 59 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47, 48, 76, 57, 58 и 59 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 49, 50, 85, 60, 58 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 49, 50, 51, 60, 58 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 49, 50, 69, 60, 58 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 49, 50, 77, 60, 58 и 56 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления человеческий домен, связывающий BCMA, содержит scFv, содержащий VH (например, VH, описанную в данном документе) и VL (например, VL, описанную в данном документе). В некоторых вариантах осуществления VH присоединена к VL посредством линкера, например, линкера, описанного в данном документе, например, линкера, описанного в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления человеческий домен, связывающий BCMA, содержит линкер $(Gly_4\text{-}Ser)n$, где n равняется 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4 (SEQ ID NO: 26). Вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи scFv могут быть представлены, например, в любой из следующих ориентаций: вариабельная область легкой цепи-линкер-вариабельная область тяжелой цепи или вариабельная область тяжелой цепи-линкер-вариабельная область легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий BCMA, представляет собой фрагмент, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий BCMA, представляет собой Fv, Fab (Fab')2 или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). В некоторых вариантах осуществления антитела и их фрагменты по настоящему изобретению связываются с белком BCMA с аффинностью дикого типа или усиленной аффинностью.

В некоторых случаях scFv можно получить в соответствии со способом, известным из уровня техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 и Huston et al.,

(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv можно получить путем связывания VH- и VL-областей друг с другом с помощью гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированными длиной и/или аминокислотным составом. Длина линкера может сильно влиять на укладку и взаимодействие вариабельных областей scFv. В действительности, если используют короткий полипептидный линкер (например, длиной 5-10 аминокислот), то внутрицепочечное сворачивание предотвращается. Межцепочечное сворачивание также необходимо для объединения двух вариабельных областей вместе с образованием функционального эпитопсвязывающего участка. Примеры ориентации и размера линкеров см., например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, публикациях заявок на патент США №№ 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 и публикациях согласно PCT №№ WO2006/020258 и WO2007/024715, включенных в данный документ посредством ссылки.

ScFv может содержать линкер из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или больше аминокислотных остатков между его VL- и VH-областями. Линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит группы глициновых и сериновых повторов, таких как $(Gly_4Ser)n$, где n представляет собой положительное целое число, которое равняется или больше 1 (SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой $(Gly_4Ser)_4$ (SEQ ID NO: 27) или $(Gly_4Ser)_3$(SEQ ID NO: 28). При изменении длины линкера может сохраняться или усиливаться активность, что приводит к улучшению эффективности в исследованиях активности.

CAR для CD20

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, представляет собой клетку, экспрессирующую CAR для CD20 (например, клетку, экспрессирующую CAR, который связывается с CD20 человека). В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR для CD20, содержит антигенсвязывающий домен согласно WO2016164731 и WO2018067992, включенным в данный документ посредством ссылки. Иллюстративные последовательности, связывающие CD20, или последовательности CAR для CD20 раскрыты, например, в таблицах 1-5 из WO2018067992. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD20 содержит CDR, вариабельную область, scFv или полноразмерную последовательность CAR для CD20, раскрытую в WO2018067992 или WO2016164731.

CAR для CD22

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, представляет собой клетку, экспрессирующую CAR для CD22 (например, клетку, экспрессирующую CAR, который связывается с CD22 человека). В

некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR для CD22, содержит антигенсвязывающий домен согласно WO2016164731 и WO2018067992, включенным в данный документ посредством ссылки. Иллюстративные последовательности, связывающие CD22, или последовательности CAR для CD22 раскрыты, например, в таблицах 6A, 6B, 7A, 7B, 7C, 8A, 8B, 9A, 9B, 10A и 10B согласно WO2016164731 и таблицах 6-10 согласно WO2018067992. В некоторых вариантах осуществления последовательность CAR для CD22 содержит CDR, вариабельную область, scFv или полноразмерную последовательность CAR для CD22, раскрытую в WO2018067992 или WO2016164731.

В ряде вариантов осуществления молекула CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22 (CAR для CD22). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацеливается на CD22 человека. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит последовательность одноцепочечного Fv, описанного в данном документе.

Последовательности CAR для CD22 человека представлены ниже. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD22 человека представляет собой CAR22-65.

Последовательность scFv CAR для CD22 человека

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTY HRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWS DAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSS DVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDE ADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL (SEQ ID NO: 285)

Вариабельная область тяжелой цепи CAR для CD22 человека

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTY HRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWS DAFDVWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 286)

Вариабельная область легкой цепи CAR для CD22 человека

QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVS NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL (SEQ ID NO 287)

Таблица 16. CDR вариабельного домена тяжелой цепи CAR для CD22 (CAR22-65)

Кандидат	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-65 согласно комбинированному определению	GDSMLSNSDTWN	288	RTYHRSTWYDDYASSVRG	290	VRLQDGNSWSDAFDV	291

CAR22-65 по Kabat	SNSDTWN	289	RTYHRSTWYDDYASSVRG	290	VRLQDGNSWSDAFDV	291

Таблица 17. CDR вариабельного домена легкой цепи CAR для CD22 (CAR22-65). Последовательности CDR LC в данной таблице имеют одинаковую последовательность согласно определению по Kabat или комбинированному определению

Кандидат	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-65 согласно комбинированному определению	TGTSSDVGGYNYVS	95	DVSNRPS	96	SSYTSSSTLYV	97

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC с любыми аминокислотными последовательностями тяжелой цепи связывающего домена, перечисленными в **таблице 16**. В ряде вариантов осуществления антигенсвязывающий домен дополнительно содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC. В ряде вариантов осуществления антигенсвязывающий домен содержит аминокислотные последовательности CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, перечисленные в **таблице 17**.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две или все из CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC с любыми аминокислотными последовательностями легкой цепи связывающего домена, перечисленными в **таблице 17**, и одну, две или все из CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC с любыми аминокислотными последовательностями тяжелой цепи связывающего домена, перечисленными в **таблице 16**.

В некоторых вариантах осуществления CDR определены в соответствии со схемой нумерации по Kabat, схемой нумерации по Chothia или их комбинацией.

Порядок, в котором VL- и VH-домены представлены в scFv, может варьироваться (т. е. в ориентации VL-VH или VH-VL), и при этом любое количество из одной, двух, трех или четырех копий субъединиц "G4S" (SEQ ID NO: 25), где каждая субъединица содержит последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 25) (например, $(G4S)_3$ (SEQ ID NO: 28) или $(G4S)_4$ (SEQ ID NO: 27)), может соединять вариабельные домены с созданием целого scFv-домена. В качестве альтернативы конструкция CAR может содержать, например, линкер, содержащий последовательность GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 43). В качестве альтернативы конструкция CAR может содержать, например, линкер, содержащий последовательность LAEAAAK (SEQ ID NO: 308). В одном варианте осуществления конструкция CAR не содержит линкер между VL- и VH-доменами.

Все эти клоны содержали изменение остатка Q/K в сигнальном домене костимулирующего домена, полученного из дзета-цепи CD3.

CAR для EGFR

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка,

экспрессирующая CAR, представляет собой клетку, экспрессирующую CAR для EGFR (например, клетку, экспрессирующую CAR, который связывается с EGFR человека). В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, представляет собой клетку, экспрессирующую CAR для EGFRvIII (например, клетку, экспрессирующую CAR, который связывается с EGFRvIII человека). Иллюстративные CAR для EGFRvIII могут содержать последовательности, раскрытые в WO2014/130657, например, в таблице 2 из WO2014/130657, включенной в данный документ посредством ссылки.

Иллюстративные последовательности, связывающие EGFRvIII, или последовательности CAR для EGFR могут содержать CDR, вариабельную область, scFv или полноразмерную последовательность CAR из CAR для EGFR, раскрытого в WO2014/130657.

CAR для мезотелина

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, представляет собой клетку, экспрессирующую CAR для мезотелина (например, клетку, экспрессирующую CAR, который связывается с мезотелином человека). Иллюстративные CAR для мезотелина могут содержать последовательности, раскрытые в WO2015090230 и WO2017112741, например, в таблицах 2, 3, 4 и 5 из WO2017112741, включенных в данный документ посредством ссылки.

Другие иллюстративные CAR

В других вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, могут специфично связываться с CD123, например, могут содержать молекулу CAR (например, любую из CAR1-CAR8) или антигенсвязывающий домен согласно таблицам 1-2 из WO 2014/130635, включенной в данный документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности молекул и антигенсвязывающих доменов CAR для CD123 (например, содержащих одну, две, три CDR VH и одну, две, три CDR VL согласно Kabat или Chothia) и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, указаны в WO 2014/130635. В других вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, могут специфично связываться с CD123, например, могут содержать молекулу CAR (например, любую из молекул от CAR123-1 до CAR123-4 и от hzCAR123-1 до hzCAR123-32) или ее антигенсвязывающий домен согласно таблицам 2, 6 и 9 из WO2016/028896, включенной в данный документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности молекул и антигенсвязывающих доменов CAR для CD123 (например, содержащих одну, две, три CDR VH и одну, две, три CDR VL согласно Kabat или Chothia) и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, указаны в WO2016/028896.

В некоторых вариантах осуществления молекула CAR предусматривает CAR для CLL1, описанный в данном документе, например, CAR для CLL1, описанный в US2016/0051651A1, включенной в данный документ посредством ссылки. В ряде вариантов осуществления CAR для CLL1 содержит аминокислотную последовательность или имеет нуклеотидную последовательность, показанные в US2016/0051651A1,

включенной в данный документ посредством ссылки. В других вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, могут специфично связываться с CLL-1, например, могут содержать молекулу CAR или антигенсвязывающий домен согласно таблице 2 из WO2016/014535, включенной в данный документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности молекул и антигенсвязывающих доменов CAR для CLL-1 (например, содержащих одну, две, три CDR VH и одну, две, три CDR VL согласно Kabat или Chothia) и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, указаны в WO2016/014535.

В некоторых вариантах осуществления молекула CAR предусматривает CAR для CD33, описанный в данном документе, например, CAR для CD33, описанный в US2016/0096892A1, включенной в данный документ посредством ссылки. В ряде вариантов осуществления CAR для CD33 содержит аминокислотную последовательность или имеет нуклеотидную последовательность, показанные в US2016/0096892A1, включенной в данный документ посредством ссылки. В других вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, могут специфично связываться с CD33, например, могут содержать молекулу CAR (например, любую из молекул от CAR33-1 до CAR-33-9) или антигенсвязывающий домен согласно таблице 2 или 9 из WO2016/014576, включенной в данный документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности молекул и антигенсвязывающих доменов CAR для CD33 (например, содержащих одну, две, три CDR VH и одну, две, три CDR VL согласно Kabat или Chothia) и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, указаны в WO2016/014576.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи - CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC - из антитела, описанного в данном документе (например, антитела, описанного в WO2015/142675, US-2015-0283178-A1, US-2016-0046724-A1, US2014/0322212A1, US2016/0068601A1, US2016/0051651A1, US2016/0096892A1, US2014/0322275A1 или WO2015/090230, включенных в данный документ посредством ссылки), и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи - CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC - из антитела, описанного в данном документе (например, антитела, описанного в WO2015/142675, US-2015-0283178-A1, US-2016-0046724-A1, US2014/0322212A1, US2016/0068601A1, US2016/0051651A1, US2016/0096892A1, US2014/0322275A1 или WO2015/090230, включенных в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела, указанного выше.

В ряде вариантов осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описанный в WO2015/142675, US-2015-0283178-A1, US-2016-0046724-A1, US2014/0322212A1, US2016/0068601A1, US2016/0051651A1, US2016/0096892A1, US2014/0322275A1 или WO2015/090230, включенных в данный документ посредством ссылки.

В ряде вариантов осуществления антигенсвязывающий домен нацеливается на BCMA и описан в US-2016-0046724-A1. В ряде вариантов осуществления

антигенсвязывающий домен нацеливается на CD19 и описан в US-2015-0283178-A1. В ряде вариантов осуществления антигенсвязывающий домен нацеливается на CD123 и описан в US2014/0322212A1, US2016/0068601A1. В ряде вариантов осуществления антигенсвязывающий домен нацеливается на CLL1 и описан в US2016/0051651A1. В ряде вариантов осуществления антигенсвязывающий домен нацеливается на CD33 и описан в US2016/0096892A1.

Иллюстративные антигены-мишени, на которые можно нацеливаться с помощью клеток, экспрессирующих CAR, включают без ограничения, среди прочих, CD19, CD123, EGFRvIII, CD33, мезотелин, BCMA и GFR-альфа 4, описанные, например, в WO2014/153270, WO 2014/130635, WO2016/028896, WO 2014/130657, WO2016/014576, WO 2015/090230, WO2016/014565, WO2016/014535 и WO2016/025880, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В других вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, могут специфично связываться с GFR-альфа 4, например, могут содержать молекулу CAR или антигенсвязывающий домен согласно таблице 2 из WO2016/025880, включенной в данный документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности молекул и антигенсвязывающих доменов CAR для GFR-альфа 4 (например, содержащих одну, две, три CDR VH и одну, две, три CDR VL согласно Kabat или Chothia) и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, указаны в WO2016/025880.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен любой из молекул CAR, описанных в данном документе (например, для любого из CD19, CD123, EGFRvIII, CD33, мезотелина, BCMA и GFR-альфа 4), содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи - CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC - из антитела, указанного выше, и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи - CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC - из антигенсвязывающего домена, указанного выше. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела, указанного или описанного выше.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи - CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC - из антитела, указанного выше, и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи - CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC - из антитела, указанного выше. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела, указанного или описанного выше.

В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой опухолевый антиген, описанный в международной заявке WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из одного или нескольких из CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (также называемого CD2

субпопуляции 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); молекулы 1, подобной лектинам C-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); антигена созревания B-клеток (BCMA), являющегося представителем семейства рецепторов TNF; Tn-антигена ((Ag Tn) или (GalNAcα-Ser/Thr)); простатического специфического мембранного антигена (PSMA); орфанного рецептора 1, подобного рецепторной тирозинкиназе (ROR1); Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; раково-эмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; альфа-субъединицы рецептора интерлейкина 11 (IL-11Ra); антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA); сериновой протеазы 21 (тестизина или PRSS21); рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2); антигена системы Льюис (Y); CD24; рецептора фактора роста тромбоцитов бета-типа (PDGFR-бета); стадиеспецифического эмбрионального антигена 4 (SSEA-4); CD20; рецептора фолиевой кислоты альфа; рецепторной тирозинпротеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, ассоциированного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простазы; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутантного фактора элонгации 2 (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы бета-типа 9 протеасомы (просомы, мультикаталитической протеазы) (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); онкогенного слитого белка, состоящего из кластерного региона точечных разрывов (BCR) и гомолога 1 онкогена вируса лейкоза мышей Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина A-типа (EphA2); фукозил-GM1; молекулы адгезии, представляющей собой сиалилированный антиген системы Льюис (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); ганглиозида o-ацетил-GD2 (OAcGD2); рецептора фолиевой кислоты бета; опухолевого эндотелиального маркера 1 (TEM1/CD248); белка, родственного опухолевому эндотелиальному маркеру 7 (TEM7R); клаудина 6 (CLDN6); рецептора тиреотропного гормона (TSHR); представителя D группы 5 класса C рецепторов, сопряженных с G-белками (GPRC5D); белка, кодируемого открытой рамкой считывания 61 X-хромосомы (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; плацентоспецифического белка 1 (PLAC1); гексасахаридной части гликоцерамида globoH (GloboH); дифференцировочного антигена молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора 1 вируса гепатита A (HAVCR1); бета-3-адренорецептора (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); рецептора 20, сопряженного с G-белком (GPR20); антигена локуса K9 комплекса лимфоцитарных антигенов 6 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка,

кодируемого альтернативной рамкой считывания гена TCR-гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); раково-тестикулярного антигена 1 (NY-ESO-1); раково-тестикулярного антигена 2 (LAGE-1a); антигена 1, ассоциированного с меланомой (MAGE-A1); белка, кодируемого транслокационным вариантом 6 гена ETS, локализованным в p-плече 12 хромосомы (ETV6-AML); белка спермы 17 (SPA17); представителя 1A семейства X-антигенов (XAGE1); ангиопоэтин-связывающего рецептора клеточной поверхности 2 (TIE-2); раково-тестикулярного антигена меланомы 1 (MAD-CT-1); раково-тестикулярного антигена меланомы 2 (MAD-CT-2); Fos-родственного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутантного p53; простеина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена 1 карциномы предстательной железы (PCTA-1 или галектина 8), антигена меланомы 1, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутантного антигена саркомы крыс (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); антигена саркомы с точечными разрывами при транслокации; меланомного ингибитора апоптоза (ML-IAP); ERG (продукта слитого гена трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) и ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парным box-доменом Pax-3 (PAX3); андрогенового рецептора; циклина B1; нейробластомного гомолога онкогена вируса миелоцитоматоза птиц v-myc (MYCN); представителя C семейства гомологов Ras (RhoC); белка 2, родственного тирозиназе (TRP-2); цитохрома P450 1B1 (CYP1B1); белка, подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с "цинковыми пальцами") (BORIS или "брата регулятора импринтированных сайтов"), антигена плоскоклеточной карциномы 3, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парным box-доменом Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TES1); лимфоцитоспецифической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы A (AKAP-4); антигена 2 синовиальной саркомы с точечным разрывом в X-хромосоме (SSX2); рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE-1); почечного убиквитарного белка 1 (RU1); почечного убиквитарного белка 2 (RU2); легумаина; E6 вируса папилломы человека (E6 HPV); E7 вируса папилломы человека (E7 HPV); кишечной карбоксилэстеразы; мутантного белка теплового шока 70-2 (мутантного варианта hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; иммуноглобулиноподобного рецептора 1, ассоциированного с лейкоцитами (LAIR1); рецептора Fc-фрагмента IgA (FCAR или CD89); представителя 2 подсемейства A лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LILRA2); представителя f семейства белков, подобных молекулам CD300 (CD300LF); представителя A семейства 12 лектиновых доменов C-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2, подобного муциноподобному рецептору гормона, содержащего EGF-подобный модуль (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); антигена 5, подобного Fc-рецептору (FCRL5); и полипептида 1, подобного иммуноглобулину лямбда (IGLL1).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи - CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC - из антитела, указанного выше, и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи -

CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC - из антитела, указанного выше. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела, указанного или описанного выше.

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий опухолевый антиген, представляет собой фрагмент, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления связывающий домен для антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе, представляет собой Fv, Fab (Fab')2 или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). В некоторых вариантах осуществления антитела и их фрагменты по настоящему изобретению связываются с белком, представляющим собой антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе, с аффинностью антител дикого типа или усиленной аффинностью.

В некоторых случаях scFv можно получить в соответствии со способом, известным из уровня техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv можно получить путем связывания VH- и VL-областей друг с другом с помощью гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированными длиной и/или аминокислотным составом. Длина линкера может сильно влиять на укладку и взаимодействие вариабельных областей scFv. В действительности, если используют короткий полипептидный линкер (например, длиной 5-10 аминокислот), то внутрицепочечное сворачивание предотвращается. Межцепочечное сворачивание также необходимо для объединения двух вариабельных областей вместе с образованием функционального эпитопсвязывающего участка. Примеры ориентации и размера линкеров см., например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, публикациях заявок на патент США №№ 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 и публикациях согласно PCT №№ WO2006/020258 и WO2007/024715, которые включены в данный документ посредством ссылки.

ScFv может содержать линкер из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или больше аминокислотных остатков между его VL- и VH-областями. Линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит группы глициновых и сериновых повторов, таких как $(Gly_4Ser)n$, где n представляет собой положительное целое число, которое равняется или больше 1 (SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой $(Gly_4Ser)_4$ (SEQ ID NO: 27) или $(Gly_4Ser)_3$(SEQ ID NO: 28). При изменении длины линкера может сохраняться или усиливаться активность, что приводит к улучшению эффективности в исследованиях активности.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой Т-клеточный рецептор ("TCR") или его фрагмент, например, одноцепочечный TCR (scTCR). Способы получения таких TCR известны из уровня техники. См., например, Willemsen RA et al, Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004); Aggen et al, Gene Ther. 19(4):365-74 (2012) (литературные источники включены в данный документ во всей своей полноте). Например, может быть сконструирован scTCR, который содержит гены Vα и Vβ из клона Т-клеток, связанные с помощью линкера (например, гибкого пептида). Данный подход является весьма применимым для мишени, ассоциированной с раком, которая сама по себе является внутриклеточной, однако фрагмент такого антигена (пептида) презентируется на поверхности раковых клеток с помощью MHC.

Трансмембранный домен

Что касается трансмембранного домена, в различных вариантах осуществления CAR можно разработать таким образом, чтобы он содержал трансмембранный домен, присоединенный к внеклеточному домену CAR. Трансмембранный домен может содержать одну или несколько дополнительных аминокислот, прилегающих к трансмембранной области, например, одну или несколько аминокислот, относящихся к внеклеточной области белка, из которого получен трансмембранный домен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и вплоть до 15 аминокислот внеклеточной области), и/или одну или несколько дополнительных аминокислот, относящихся к внутриклеточной области белка, из которого получен трансмембранный домен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и вплоть до 15 аминокислот внутриклеточной области). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой домен, ассоциированный с одним из остальных используемых доменов CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен можно выбрать или модифицировать с помощью аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других поверхностных мембранных белков, например, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими элементами рецепторного комплекса. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим CAR на поверхности клетки, экспрессирующей CAR, например, CAR-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления аминокислотную последовательность трансмембранного домена можно модифицировать или подвергнуть замене таким образом, чтобы свести к минимуму взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, присутствующего в той же клетке, экспрессирующей CAR, например, CART.

Трансмембранный домен может быть получен из природного либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен способен передавать сигнал внутриклеточному(внутриклеточным) домену(доменам) всякий раз, когда CAR связался с мишенью. Трансмембранный домен, особенно применимый в настоящем изобретении,

может включать по меньшей мере трансмембранную(трансмембранные) область(области), например, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8 (например, CD8-альфа, CD8-бета), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может содержать по меньшей мере трансмембранную(трансмембранные) область(области) костимулирующей молекулы, например, молекулы MHC I класса, белковых рецепторов TNF, иммуноглобулиноподобных белков, рецепторов цитокинов, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, лиганда Toll-подобного рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганда, который специфично связывается с CD83.

В некоторых случаях трансмембранный домен может быть присоединен к внеклеточной области CAR, например, антигенсвязывающему домену CAR, с помощью шарнирной области, например, шарнирной области из белка человека. Например, в некоторых вариантах осуществления шарнирная область может представлять собой шарнирную область Ig (иммуноглобулина) человека, например, шарнирную область IgG4 или шарнирную область CD8a. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер содержат аминокислотную последовательность (например, состоят из нее) под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен (например, состоит из него) под SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область IgG4. Например, в некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область под SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область, кодируемую нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область включает в себя шарнирную область IgD. Например, в некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область, кодируемую

нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может быть рекомбинантным, и в этом случае он будет содержать главным образом гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых вариантах осуществления на каждом конце рекомбинантного трансмембранного домена может находиться триплет из фенилаланина, триптофана и валина.

Короткий олиго- или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот необязательно может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью CAR. Глицин-сериновый дублет является особенно подходящим линкером. Например, в некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область KIR2DS2.

Цитоплазматический домен

Цитоплазматические домен или область CAR по настоящему изобретению содержат внутриклеточный сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен обычно отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую был введен CAR.

Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для применения в CAR по настоящему изобретению включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторов, которые действуют совместно с инициированием передачи сигнала после вступления в контакт с антигенным рецептором, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любую рекомбинантную последовательность, которая обладает такими же функциональными способностями.

Известно, что сигналы, образуемые при участии только TCR, являются недостаточными для полной активации Т-клетки, и что также необходим вторичный и/или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредуется двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (первичные внутриклеточные сигнальные домены), и теми, которые действуют антигеннезависимым образом, передавая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичный цитоплазматический домен, например, костимулирующий домен).

Первичный сигнальный домен регулирует первичную активацию комплекса TCR стимулирующим образом либо ингибирующим образом. Первичные внутриклеточные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие

мотивы или ITAM.

Примеры ITAM-содержащих первичных внутриклеточных сигнальных доменов, которые являются особенно применимыми в настоящем изобретении, включают домены из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как "ICOS"), FcεRI, DAP10, DAP12 и CD66d. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен содержит модифицированный домен ITAM, например, мутантный домен ITAM, который обладает измененной (например, повышенной или пониженной) активностью по сравнению с нативным доменом ITAM. В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен содержит модифицированный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, оптимизированный и/или усеченный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен содержит один, два, три, четыре или больше мотивов ITAM.

Дополнительные примеры молекул, содержащих первичный внутриклеточный сигнальный домен, являющихся особенно применимыми в настоящем изобретении, включают молекулы DAP10, DAP12 и CD32.

Внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать первичный сигнальный домен, например, сигнальный домен CD3-дзета, в отдельности или в комбинации с любым(любыми) другим(другими) требуемым(требуемыми) внутриклеточным(внутриклеточными) сигнальным(сигнальными) доменом(доменами), применимым(применимыми) в качестве составной части CAR по настоящему изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать первичный сигнальный домен, например, часть дзета-цепи CD3, и костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий сигнальный домен относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от антигенного рецептора или его лигандов, которая необходима для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры такой молекулы включают молекулу MHC I класса, белковые рецепторы TNF, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, лиганд Toll-подобного рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL,

DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфично связывается с CD83, и т. п. Например, было продемонстрировано, что костимуляция с помощью CD27 усиливает размножение, эффекторную функцию и выживание CAR-T-клеток человека in vitro и усиливает персистенцию и противоопухолевую активность Т-клеток человека in vivo (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706). Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части CAR по настоящему изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или установленном порядке. Короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот) необязательно может образовывать связь между внутриклеточными сигнальными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления в качестве подходящего линкера может применяться глицин-сериновый дублет. В некоторых вариантах осуществления в качестве подходящего линкера может применяться одна аминокислота, например, аланин, глицин.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен разработан таким образом, что он содержит два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более, костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более, костимулирующих сигнальных доменов разделены линкерной молекулой, например, линкерной молекулой, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит два костимулирующих сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления линкерная молекула представляет собой глициновый остаток. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой аланиновый остаток.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен разработан таким образом, что он содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен разработан таким образом, что он содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен 4-1BB представляет собой сигнальный домен под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3-дзета представляет собой сигнальный домен под SEQ ID NO: 9 (мутантный CD3-дзета) или SEQ ID NO: 10 (CD3-дзета человека дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен разработан таким образом, что он содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD27. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD27 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD27 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен разработан таким образом, что он содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD28 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен разработан таким образом, что он содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен ICOS. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен ICOS содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен ICOS кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 39.

Совместная экспрессия CAR с другими молекулами или средствами

Совместная экспрессия второго CAR

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, может дополнительно содержать второй CAR, например, второй CAR, который содержит другой антигенсвязывающий домен, например, для той же мишени (например, CD19) или другой мишени (например, для мишени, отличной от CD19, например, мишени, описанной в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, например, клетка, экспрессирующая CAR, изготовленная посредством способа, описанного в данном документе, содержит (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый CAR, который связывается с BCMA, и (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CAR, который связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления первый CAR содержит домен, связывающий BCMA, первый трансмембранный домен и первый внутриклеточный сигнальный домен, где домен, связывающий BCMA, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR3 HC), и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR3 LC), где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 87, 88, 95, 96 и 97 соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй CAR содержит домен, связывающий CD19, второй трансмембранный домен и второй внутриклеточный сигнальный домен, где домен, связывающий CD19, содержит VH, содержащую CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, и VL, содержащую CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные

последовательности под SEQ ID NO: 295, 304 и 297-300 соответственно. В некоторых вариантах осуществления (i) VH и VL домена, связывающего BCMA, содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 93 и 102 соответственно. В некоторых вариантах осуществления VH и VL домена, связывающего CD19, содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 250 и 251 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий BCMA, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD19, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 293. В некоторых вариантах осуществления первый CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления второй CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 225.

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, например, клетка, экспрессирующая CAR, изготовленная посредством способа, описанного в данном документе, содержит (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CAR, который связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD22 содержит антигенсвязывающий домен для CD22, а также первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит антигенсвязывающий домен для CD19, а также второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и/или второй первичный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 16, 17, 30, 31 или 32; и/или одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 16, 17, 30, 31 или 32. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 16, 17, 30, 31 или 33; и/или CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 16, 17, 30, 31 или 33. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит одну или несколько (например, все три) из CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 2,

30, 31 или 32, и/или одну или несколько (например, все три) из CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 2, 30, 31 и 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 2, 30, 31 и 32; и/или CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 2, 30, 31 и 32.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 (например, scFv) содержит вариабельную область легкой цепи (VL) домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 30 или 32; и/или вариабельную область тяжелой цепи (VH) домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит VL-область, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности VL-области CD22, представленной в таблице 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит VL-область, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в таблице 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит VH-область, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности VH-области CD22, представленной в таблице 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит VH-область, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность VH-области для CD22, представленную в таблице 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 (например, scFv) содержит VL-область домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 2, 30 или 32; и/или VH-область домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 2, 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит VL-область, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности VL-области CD19, представленной в таблицах 2, 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит

VL-область, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность VL-области для CD19, представленную в таблицах 2, 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит VH-область, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности VH-области CD19, представленной в таблицах 2, 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит VH-область, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность VH-области для CD19, представленную в таблицах 2, 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности scFv для CD22, представленной в таблице 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD22, представленную в таблице 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности scFv для CD19, представленной в таблицах 2, 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD19, представленную в таблицах 2, 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления молекула CAR для CD22 и/или молекула CAR для CD19 содержит дополнительный компонент, например, сигнальный пептид, шарнирную область, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен, сайт P2A и/или линкер, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в таблице 33, или

последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей; или кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в таблице 33, или последовательностью, характеризующейся по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей.

Иллюстративные нуклеотидные и аминокислотные последовательности молекулы CAR, например, молекулы двойного CAR, содержащей (i) первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) второй CAR, который связывается с CD19, раскрытой в данном документе, представлены в таблице 30.

Таблица 30. Последовательности двойных и тандемных CAR для CD19-CD22

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
Тандемные CAR для CD19-CD22		
CG#c171	725	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgt cttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacagg ctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcgg tagcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgt ctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagat taaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaac tccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgag cggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctgg aatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtc accatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagcc gacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattact ggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcttggcagaagccgccgcgaaagaagtgc agcttcaacaatcaggaccaggactcgtcaaaccatcacagaccctctccctcacatgtgcca tctccggggactccatgttgagcaattccgacacttggaattggattagacaaagcccgtccc ggggtctggaatggttgggacgcacctaccaccggtctacttggtacgacgactacgcgtcat ccgtgcggggaagagtgtccatcaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagct taatgccgtgactcctgaggatacgggcgtctactactgcgcccgcgtccgcctgcaagacg ggaacagctggagcgatgcattcgatgtctggggccagggaactatggtcaccgtgtcgtct gggggcggtggatcgggtggcgggggttcgggggggcggcggctctcagtccgctcttacc caaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtgaccatttcctgcaccggcactt

		catccgacgtgggcggctacaactacgtgtcctggtaccaacagcacccgggaaaggcccc caagctcatgatctacgacgtgtccaacaggccctcgggagtgtccaaccggttctcgggttc gaaatcgggaaacacagccagcctgaccatcagcggactgcaggctgaagatgaagccga ctactactgctcctcctacacctcgtcatccacgctctacgtgttcggcactggaactcagctga ctgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctccca gcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccgg ggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgct gctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagc aacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccca gaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca gcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagt acgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcag aaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctat agcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtacca gggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcct cgg
	726	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSS LKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYG GSYAMDYWGQGTLVTVSSLAEAAAKEVQLQQSGPGLVKP SQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTY HRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDT GVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGG YNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR

CG#c182	727	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aagtgcagcttcaacaatcaggaccaggactcgtcaaaccatcacagaccctctccctcacat gtgccatctccggggactccatgttgagcaattccgacacttggaattggattagacaaagcc cgtcccggggtctggaatggttgggacgcacctaccaccggtctacttggtacgacgactac gcgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaacgtggacacctccaagaaccagtacagcc tgcagcttaatgccgtgactcctgaggatacgggcgtctactactgcgcccgcgtccgcctgc aagacgggaacagctggagcgatgcattcgatgtctggggccagggaactatggtcaccgt gtcgtctgggggcggtggatcgggtggcgggggttcgggggggcggcggctctcagtccgc tcttacccaaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtgaccatttcctgcaccg gcacttcatccgacgtgggcggctacaactacgtgtcctggtaccaacagcacccgggaaa ggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaacaggccctcgggagtgtccaaccggttct cgggttcgaaatcgggaaacacagccagcctgaccatcagcggactgcaggctgaagatg aagccgactactactgctcctcctacacctcgtcatccacgctctacgtgttcggcactggaac tcagctgactgtgctgggaggggggagggagtgaaattgtgatgacccagtcacccgccactc ttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaata ccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccg gctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcac tatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccc tacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtg ggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagc catcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtctt ggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagact acttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagg tgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcatta ctattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccag caccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgt ccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttga cttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcact cgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttca tgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagga ggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacca gcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatc cccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagat tggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactca

		gcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
	728	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSL TCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCA RVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGGGSE IVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQ APRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAV YFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKG LEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSV TAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
CG#c188	729	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc agtccgctcttacccaaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtgaccatttcc tgcaccggcacttcatccgacgtgggcggctacaactacgtgtcctggtaccaacagcaccc gggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaacaggccctcgggagtgtccaac cggttctcgggttcgaaatcgggaaacacagccagcctgaccatcagcggactgcaggctg aagatgaagccgactactactgctcctcctacacctcgtcatccacgctctacgtgttcggcac tggaactcagctgactgtgctgggcggaggaggctccgaagtgcagcttcaacaatcagga ccaggactcgtcaaaccatcacagaccctctccctcacatgtgccatctccggggactccatg ttgagcaattccgacacttggaattggattagacaaagcccgtcccggggtctggaatggttg ggacgcacctaccaccggtctacttggtacgacgactacgcgtcatccgtgcggggaagagt gtccatcaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcctga ggatacgggcgtctactactgcgcccgcgtccgcctgcaagacgggaacagctggagcgat gcattcgatgtctggggccagggaactatggtcaccgtgtcgtctggaggggagggagtg aaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgt cttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacagg

		ctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcgg tagcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgt ctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagat taaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaac tccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgag cggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctgg aatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtc accatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagcc gacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattact ggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccaccca ccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgca gctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctc tggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaat tcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaact caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
	730	MALPVTALLLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQSVTI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLY VFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS GDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRL QDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSEIVMTQSPATL SLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTL PYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWG SETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT

		CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR
CG#c224	731	atggccctgcccgtgactgcgctcctgcttccgttggccctgctcctgcatgccgccagacct cagtccgctctgactcagccggcctcagcttcggggtcccctggtcaaagcgtcactatttcct gtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctggtaccaacagcacccc ggaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggccgtcaggagtgtccaacag attctccggctccaagagcggaaacactgccagcttgaccattagcggcttgcaggccgagg acgaagccgactactactgctctagctacacatcctcgtctaccctctacgtgtttggaacggg gacccagctgactgtgctcgggggtggaggatcagaggtgcaactccagcagtccggtcct ggcctcgtgaaaccgtcccaaaccctgtccctgacttgcgccatctcgggcgactccatgctg tccaattccgacacctggaactggattagacaatcgcctagccggggactcgaatggctggg ccggacctaccaccggtccacgtggtatgacgactacgcaagctccgtccggggaagggtg tccattaacgtcgatacctccaagaaccagtacagccttcagctgaacgctgtgacccccgag gataccggcgtctactactgtgcaagagtgcgattgcaggatggaaactcgtggtcggacgc attcgatgtctggggacagggaactatggtgaccgtgtcctcgggcggaggcgggagcgga ggaggaggctctggcggaggaggaagcgagattgtcatgactcagtccccggccacactct ccctgtcacccggagaaagagcaaccctgagctgcagggcgtcccaggacatctcgaagta cctgaactggtaccagcagaagcctggacaagcaccccgcctcctgatctaccacacctcgc ggctgcattcgggaatccccgccagattctcagggagcggatcaggaaccgactacaccct gactatctcgagcctgcaaccagaggatttcgccgtgtacttctgccagcaaggaaacaccct gccctacacctttggacagggaaccaagctcgagattaaggggggtggtggatcgggagg gggtggatcaggaggaggcggctcacaagtccagctgcaagaatccggtccgggacttgtg aagccgtccgaaaccctgtcactgacttgcactgtgtccggggtgtcattgcccgactacggc gtgagctggattcggcagcccccctggaaagggattggaatggatcggcgtgatctggggttc ggaaactacctactatcagtcctcactgaagtcccgcgtgaccatcagcaaggataattccaa aaaccaagtgtctctgaagctctccagcgtcactgccgccgatactgccgtgtactactgcgc caagcactactattacggcggttcgtacgccatggactactggggccaagggacactcgtga ccgtgtcatccaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccc ggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctg ctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaag caacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccca

		gaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca gcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagt acgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcag aaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctat agcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtacca gggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcct cgg
	732	MALPVTALLLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQSVTI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLY VFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS GDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRL QDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPG QAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK GLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSS VTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
CG#c227	733	atggccctgcccgtgactgcgctcctgcttccgttggccctgctcctgcatgccgccagacct cagtccgctctgactcagccggcctcagcttcggggtcccctggtcaaagcgtcactatttcct gtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctggtaccaacagcacccc ggaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggccgtcaggagtgtccaacag attctccggctccaagagcggaaacactgccagcttgaccattagcggcttgcaggccgagg acgaagccgactactactgctctagctacacatcctcgtctaccctctacgtgtttggaacggg gacccagctgactgtgctcgggggtggaggatcagaggtgcaactccagcagtccggtcct ggcctcgtgaaaccgtcccaaaccctgtccctgacttgcgccatctcgggcgactccatgctg tccaattccgacacctggaactggattagacaatcgcctagccggggactcgaatggctggg

		ccggacctaccaccggtccacgtggtatgacgactacgcaagctccgtccggggaagggtg tccattaacgtcgatacctccaagaaccagtacagccttcagctgaacgctgtgacccccgag gataccggcgtctactactgtgcaagagtgcgattgcaggatggaaactcgtggtcggacgc attcgatgtctggggacagggaactatggtcactgtgtcctccggcggtggaggctcggggg ggggcggctcaggaggaggcggctcacaagtccagctgcaagaatccggtccgggacttg tgaagccgtccgaaaccctgtcactgacttgcactgtgtccggggtgtcattgcccgactacg gcgtgagctggattcggcagccccctggaaagggattggaatggatcggcgtgatctgggg ttcggaaactacctactatcagtcctcactgaagtcccgcgtgaccatcagcaaggataattcc aaaaaccaagtgtctctgaagctctccagcgtcactgccgccgatactgccgtgtactactgc gccaagcactactattacggcggttcgtacgccatggactactggggacaaggcactcttgtg actgtgtcaagcggcggtggagggagcggtgggggcggttcaggaggaggcggatcaga gatcgtgatgacccaatccccagccaccctgtccctcagccctggagaaagagccaccctga gctgccgggcctcccaggatatcagcaagtacttgaactggtaccaacaaaagccggggca ggcgccccggctcctgatctaccacacctcgcgcctccactcaggtatccccgccagattctc agggagcggctccggtactgactacaccctgactatttcctcactgcagccagaggactttgc cgtgtacttctgccagcagggaaacactctgccgtacaccttcgggcagggaacgaagcttg aaattaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctccca gcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccgg ggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgct gctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagc aacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccca gaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca gcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagt acgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcag aaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctat agcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtacca gggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcct cgg
	734	MALPVTALLLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQSVTI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSG VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLY VFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS GDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYA SSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRL QDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS

		QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP GKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
Двойные CAR для CD19-CD22		
CG#c201		
Нуклеиновая кислота, кодирующая полноразмерный двойной CAR для CD19-CD22	735	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aagtgcagctgcagcagtcagggcctggcctggtcaagccgtcgcagaccctctccctgac atgcgccattagcggggactccatgctgagcaactcggacacctggaactggattcggcagt ccccttcccggggactcgagtggctcggacgcacctaccatcggagcacttggtacgacga ctacgcctcctccgtgagaggtcgcgtgtcgatcaacgtggatacctcgaagaaccagtatag cttgcaactgaacgccgtgacccctgaggataccggagtgtactattgtgcgagagtcaggct gcaagacggaaactcctggtccgacgcatttgatgtctggggacagggtactatggtcacgg tgtcatctggaggcggaggatcgcaaagcgccctgactcagccggcttcggctagcggttca ccggggcagtccgtgactatctcctgcaccgggacttcctccgacgtgggaggctacaatta cgtgtcctggtaccagcaacaccccggcaaagccccaaagctgatgatctacgacgtcagc aacagacccagcggagtgtccaaccggttcagcggctccaagtccggcaacaccgcctccc tgaccatcagcgggcttcaggccgaagatgaggcggattactactgctcctcgtacacctcaa gctcaactctgtacgtgttcggcaccggtactcagctcaccgtgctgaccactaccccagcac cgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggc atgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatcta catttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt aagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagact actcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaa ctgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccag ctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtac

		aacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggac acctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcggggaagcggagctactaacttcag cctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaaccctggacctatggccttaccagtgacc gccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccggaaattgtgatgaccca gtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctccca agacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatc taccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggac cgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaa gggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtg gcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcgg accgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctcc ccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtg atttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaagg acaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgt actattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgccca ccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggc gcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgg gacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttttactgcaaacggggcagaaagaaa ctcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggct gtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcag gagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatcta ggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggg ggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataag atggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggca cgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgc aggccctgcccccctcgc
Аминокислотная последовательность полноразмерного двойного CAR для	736	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSL TCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCA RVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQP ASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPL

CD19-CD22		SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLAL LLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGG SGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT LVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR для CD22 (с сайтом P2A)	737	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSL TCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCA RVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQP ASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPG
CAR для CD19	738	PMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPA RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQG TKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL

		TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
CG#c203		
Нуклеиновая кислота, кодирующая полноразмерный двойной CAR для CD19-CD22	739	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccg gaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctg tcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacag gctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcg gtagcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgct gtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgag attaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtcca actccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtg agcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtct ggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgc gtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgca gccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggatt actggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccacgacgccagcgccgcgaccac caacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggc cagcggcgggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctg ggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaac ggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactca agaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgaga gtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctat aacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccggg accctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaac tgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccgga ggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacg acgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgcggaagcggagctactaacttcagcctgctg aagcaggctggagacgtggaggagaaccctggacctatggccctccctgtcaccgccctgc

		tgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaagtgcagctgcagcagtcaggg cctggcctggtcaagccgtcgcagaccctctccctgacatgcgccattagcggggactccat gctgagcaactcggacacctggaactggattcggcagtccccttcccggggactcgagtgg ctcggacgcacctaccatcggagcacttggtacgacgactacgcctcctccgtgagaggtcg cgtgtcgatcaacgtggatacctcgaagaaccagtatagcttgcaactgaacgccgtgaccc ctgaggataccggagtgtactattgtgcgagagtcaggctgcaagacggaaactcctggtcc gacgcatttgatgtctggggacagggtactatggtcacggtgtcatctggaggcggaggatc gcaaagcgccctgactcagccggcttcggctagcggttcaccggggcagtccgtgactatct cctgcaccgggacttcctccgacgtgggaggctacaattacgtgtcctggtaccagcaacac cccggcaaagccccaaagctgatgatctacgacgtcagcaacagacccagcggagtgtcca accggttcagcggctccaagtccggcaacaccgcctccctgaccatcagcgggcttcaggc cgaagatgaggcggattactactgctcctcgtacacctcaagctcaactctgtacgtgttcggc accggtactcagctcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctc ctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggg gccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctg ctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgtt catgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgca gcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggt cggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcg ggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataaga tggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacg acggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgca ggccctgccgcctcgg
Аминокислотная последовательность полноразмерного двойного CAR для CD19-CD22	740	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSS LKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYG GSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA

		YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLL HAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDT WNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSIN VDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDA FDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTIS CTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVF GTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR для CD19 (с сайтом P2A)	741	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSS LKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYG GSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPG
CAR для CD22	742	PMALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLS LTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTW YDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYC ARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALT QPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG

		VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
CG#c230		
Нуклеиновая кислота, кодирующая полноразмерный двойной CAR для CD19-CD22	743	atggcacttcccgtcaccgccctgctgctcccactcgccctccttctgcacgccgcccgcccc gaagtgcagctgcagcagtcaggaccgggcctggtcaaaccttcgcagactctgtccctgac ttgcgctataagcggggactccatgctgagcaattcggacacttggaactggattcgccaaag ccccagccggggtctggaatggctgggaaggacctaccatcgctctacttggtacgacgact acgccagctccgtgcgaggacgcgtgtccatcaacgtggacacctccaagaaccagtactc gcttcaactcaacgcagtgacccctgaagataccggagtctactattgcgcccgcgtgcggct ccaggacgggaactcctggtcggacgctttcgatgtctggggacagggcactatggtcaccg tcagctccggcggcggcggtagccaatcggcgctgacacagccggcttccgcctcgggatc gcctggacagtcggtgaccatctcgtgcactggaacctcctccgacgtgggcggctacaatt atgtgtcatggtaccagcagcacccgggaaaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtcc aatagacctagcggggtgtcaaacagattctccggatccaaatccggaaacactgcctccctg accatttccggactgcaggccgaggacgaagccgattactactgctcctcttacacctcctcat ccaccctctacgtgtttgggactgggacccagctgaccgtcctcactaccaccccggccccg cggcccctacaccggcaccgactattgccagccagcctctctcgctgcggccggaggcct gccgcccagccgccggcggagccgtgcacacccgcggtctggacttcgcgtgcgatatcta catctgggctccgctggccgggacttgtggcgtgctgctgctgtctctggtcatcacactgtac tgcaagcgcggaagaaagaagctgctctacatcttcaagcaacccttcatgcggcctgtgca gaccacccaggaagaggatggctgctcctgccggttcccggaggaagaagagggcggat gcgaactgcgcgtgaagttcagccgaagcgccgacgccccggcctaccagcagggccag aaccaactgtacaacgaactcaacctgggtcggagagaagagtacgacgtgctggacaaaa gacgcggcagggaccccgagatgggcggaaagcctcgccgcaagaacccgcaggaggg cctctacaacgagctgcagaaggacaagatggccgaagcctactcagagatcggcatgaag ggggagcggaggcgcgggaagggccacgacggtttgtaccaaggactttccactgcgacc aaggacacctacgatgccctccatatgcaagccctgccgccccggggttccggagctacca acttctcgctgttgaagcaggccggagatgtcgaggaaaacccgggacctatggccctgcca gtgaccgcgctcctgctgcccctggctctgctgcttcacgcggcccggcctgagattgtgatg actcagagcccggcgaccctgtccctgtccccgggggagagagcaaccctgtcgtgccgg gcctcccaagacatctcaaagtacctcaattggtatcagcagaagccaggacaggctccacg gttgctgatctaccacacttcgagactgcactcaggaatccccgcgcggttttccggttccggc

		tccgggaccgactacaccctgaccatcagctcgctccagcctgaggatttcgcagtgtacttct gtcagcaaggaaacacccttccatacaccttcggacagggtaccaagctggaaatcaaggg aggaggaggatctgggggcggtggttccggaggcggtggaagccaagtgcagctccagg aaagcggacccgggctggtcaagccgagcgaaaccctctcactgacttgtactgtgtccgga gtgtccctgcctgactatggagtgtcctggatccgacagccccccggaaagggtctggagtg gattggggtcatctggggctccgaaactacctactaccagagcagcctcaagagccgggtca ccatttcaaaggataactccaagaatcaagtgtccctgaagctgtcctcagtgacagccgcag acaccgccgtgtactactgcgccaagcactactactacggaggctcctacgcaatggactact ggggacaaggcactttggtcactgtgtcaagcaccaccacccctgcgcctcggcctcctacc ccggctcccactatcgcgagccagccgctgagcctgcggcctgaggcttgccgaccggcc gctggcggcgccgtgcatactcggggcctcgactttgcctgtgacatctacatctgggccccc ctggccggaacgtgcggagtgctgctgctgtcgctggtcattaccctgtattgcaaacgcgga aggaagaagctgttgtacattttcaagcagcccttcatgcgcccggtgcaaactactcaggag gaagatggctgttcctgtcggttccccgaagaggaagaaggcggctgcgagttgagggtca agttctcccggtccgccgatgctcccgcctaccaacaggggcagaaccagctttataacgaa ctgaacctgggcaggagggaggaatatgatgtgttggataagcgccggggccgggaccca gaaatgggggggaaagcccagaagaaagaaccctcaagagggactttacaacgaattgcag aaagacaaaatggccgaggcctactccgagattgggatgaagggcgaaagacggagagg aaaggggcacgacgggctctaccagggactcagcaccgccaccaaagatacctacgacgc cctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc
Аминокислотная последовательность полноразмерного двойного CAR для CD19-CD22	736	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSL TCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCA RVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQP ASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLAL LLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTIS

		SLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGG SGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT LVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR для CD22 (с сайтом P2A)	737	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSL TCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCA RVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQP ASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPG
CAR для CD19	738	PMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPA RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQG TKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL

		PPR

CDR для CD22 и CD19 из двойного CAR по настоящему изобретению (например, молекулы двойного CAR, содержащей (i) первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) второй CAR, который связывается с CD19) представлены в таблице 31.

Таблица 31. Последовательности CDR для CD22 и CD19

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
CDR для CD22		
HCDR1 (Kabat)	289	SNSDTWN
HCDR2 (Kabat)	290	RTYHRSTWYDDYASSVRG
HCDR3 (Kabat)	291	VRLQDGNSWSDAFDV
HCDR1 (Chothia)	744	GDSMLSNSD
HCDR2 (Chothia)	745	YHRSTWY
HCDR3 (Chothia)	291	VRLQDGNSWSDAFDV
HCDR1 (IMGT)	746	GDSMLSNSDT
HCDR2 (IMGT)	747	TYHRSTWYD
HCDR3 (IMGT)	748	ARVRLQDGNSWSDAFDV
LCDR1 (Kabat)	95	TGTSSDVGGYNYVS
LCDR2 (Kabat)	96	DVSNRPS
LCDR3 (Kabat)	97	SSYTSSSTLYV
LCDR1 (Chothia)	98	TSSDVGGYNY
LCDR2 (Chothia)	99	DVS
LCDR3 (Chothia)	100	YTSSSTLY
LCDR1 (IMGT)	101	SSDVGGYNY
LCDR2 (IMGT)	99	DVS
LCDR3 (IMGT)	97	SSYTSSSTLYV
CDR для CD19		
HCDR1 (Kabat)	749	GVSLPDYGVS
HCDR2 (Kabat)	750	VIWGSETTYYSSSLKS
	304	VIWGSETTYYQSSLKS
	751	VIWGSETTYYNSSLKS
HCDR3 (Kabat)	297	HYYYGGSYAMDY
LCDR1	298	RASQDISKYLN
LCDR2	299	HTSRLHS

LCDR3	300	QQGNTLPYT

В таблице 32 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности доменов, связывающих CD19 и CD22, из двойного CAR или тандемного CAR, раскрытого в данном документе, например, двойного CAR или тандемного CAR, содержащего (i) первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) второй CAR, который связывается с CD19.

Таблица 32. Домены, связывающие CD19 и CD22

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
scFv CAR19 в c201, c203 и тандемных CAR c171, c182, c188	752	gaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaac cctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcc cggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctg ccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgca gccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttgg acagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtcc ggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagcc atcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtg tcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggct ctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaact ctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtac tattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggt actctggtcaccgtgtccagc
	293	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTIS KDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTLVTVSS
scFv CAR19 в c224	753	Gagattgtcatgactcagtccccggccacactctccctgtcacccggagaaagagcaa ccctgagctgcagggcgtcccaggacatctcgaagtacctgaactggtaccagcaga agcctggacaagcaccccgcctcctgatctaccacacctcgcggctgcattcgggaat ccccgccagattctcagggagcggatcaggaaccgactacaccctgactatctcgagc ctgcaaccagaggatttcgccgtgtacttctgccagcaaggaaacaccctgccctacac ctttggacagggaaccaagctcgagattaaggggggtggtggatcgggaggggtg

		gatcaggaggaggcggctcacaagtccagctgcaagaatccggtccgggacttgtga agccgtccgaaaccctgtcactgacttgcactgtgtccggggtgtcattgcccgactac ggcgtgagctggattcggcagccccctggaaagggattggaatggatcggcgtgatct ggggttcggaaactacctactatcagtcctcactgaagtcccgcgtgaccatcagcaag gataattccaaaaaccaagtgtctctgaagctctccagcgtcactgccgccgatactgc cgtgtactactgcgccaagcactactattacggcggttcgtacgccatggactactggg gccaagggacactcgtgaccgtgtcatcc
	293	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTIS KDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTLVTVSS
scFv CAR19 в c227	754	Caagtccagctgcaagaatccggtccgggacttgtgaagccgtccgaaaccctgtca ctgacttgcactgtgtccggggtgtcattgcccgactacggcgtgagctggattcggca gccccctggaaagggattggaatggatcggcgtgatctggggttcggaaactacctac tatcagtcctcactgaagtcccgcgtgaccatcagcaaggataattccaaaaaccaagt gtctctgaagctctccagcgtcactgccgccgatactgccgtgtactactgcgccaagc actactattacggcggttcgtacgccatggactactggggacaaggcactcttgtgact gtgtcaagcggcggtggagggagcggtgggggcggttcaggaggaggcggatcag agatcgtgatgacccaatccccagccaccctgtccctcagccctggagaaagagcca ccctgagctgccgggcctcccaggatatcagcaagtacttgaactggtaccaacaaaa gccggggcaggcgccccggctcctgatctaccacacctcgcgcctccactcaggtat ccccgccagattctcagggagcggctccggtactgactacaccctgactatttcctcact gcagccagaggactttgccgtgtacttctgccagcagggaaacactctgccgtacacct tcgggcagggaacgaagcttgaaattaag
	755	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLS PGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG NTLPYTFGQGTKLEIK
scFv CAR19 в	756	Gagattgtgatgactcagagcccggcgaccctgtccctgtccccggggagagagc

c230		aaccctgtcgtgccgggcctcccaagacatctcaaagtacctcaattggtatcagcaga agccaggacaggctccacggttgctgatctaccacacttcgagactgcactcaggaat ccccgcgcggttttccggttccggctccgggaccgactacaccctgaccatcagctcg ctccagcctgaggatttcgcagtgtacttctgtcagcaaggaaacacccttccatacacc ttcggacagggtaccaagctggaaatcaagggaggaggaggatctgggggcggtgg ttccggaggcggtggaagccaagtgcagctccaggaaagcggacccgggctggtca agccgagcgaaaccctctcactgacttgtactgtgtccggagtgtccctgcctgactatg gagtgtcctggatccgacagccccccggaaagggtctggagtggattggggtcatctg ggctccgaaactacctactaccagagcagcctcaagagccgggtcaccatttcaaag gataactccaagaatcaagtgtccctgaagctgtcctcagtgacagccgcagacaccg ccgtgtactactgcgccaagcactactactacggaggctcctacgcaatggactactgg ggacaaggcactttggtcactgtgtcaagc
	293	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTIS KDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTLVTVSS
scFv CAR22 в c201 и c203	757	Gaagtgcagctgcagcagtcagggcctggcctggtcaagccgtcgcagaccctctcc ctgacatgcgccattagcggggactccatgctgagcaactcggacacctggaactgga ttcggcagtccccttcccggggactcgagtggctcggacgcacctaccatcggagcac ttggtacgacgactacgcctcctccgtgagaggtcgcgtgtcgatcaacgtggatacct cgaagaaccagtatagcttgcaactgaacgccgtgacccctgaggataccggagtgta ctattgtgcgagagtcaggctgcaagacggaaactcctggtccgacgcatttgatgtct ggggacagggtactatggtcacggtgtcatctggaggcggaggatcgcaaagcgcc ctgactcagccggcttcggctagcggttcaccggggcagtccgtgactatctcctgcac cgggacttcctccgacgtgggaggctacaattacgtgtcctggtaccagcaacacccc ggcaaagccccaaagctgatgatctacgacgtcagcaacagacccagcggagtgtcc aaccggttcagcggctccaagtccggcaacaccgcctccctgaccatcagcgggcttc aggccgaagatgaggcggattactactgctcctcgtacacctcaagctcaactctgtac gtgttcggcaccggtactcagctcaccgtgctg
	758	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWN WIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSIN VDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSW

		SDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQPASASGSPG QSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
scFv CAR22 в 230	759	Gaagtgcagctgcagcagtcaggaccgggcctggtcaaaccttcgcagactctgtcc ctgacttgcgctataagcggggactccatgctgagcaattcggacacttggaactggat tcgccaaagccccagccggggtctggaatggctgggaaggacctaccatcgctctact tggtacgacgactacgccagctccgtgcgaggacgcgtgtccatcaacgtggacacct ccaagaaccagtactcgcttcaactcaacgcagtgacccctgaagataccggagtcta ctattgcgcccgcgtgcggctccaggacgggaactcctggtcggacgctttcgatgtct ggggacagggcactatggtcaccgtcagctccggcggcggcggtagccaatcggcg ctgacacagccggcttccgcctcgggatcgcctggacagtcggtgaccatctcgtgca ctggaacctcctccgacgtgggcggctacaattatgtgtcatggtaccagcagcaccc gggaaaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtccaatagacctagcggggtgtca aacagattctccggatccaaatccggaaacactgcctccctgaccatttccggactgca ggccgaggacgaagccgattactactgctcctcttacacctcctcatccaccctctacgt gtttgggactgggacccagctgaccgtcctc
	758	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWN WIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSIN VDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSW SDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQPASASGSPG QSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
scFv CAR22 в 171, c182	760	Gaagtgcagcttcaacaatcaggaccaggactcgtcaaaccatcacagaccctctccc tcacatgtgccatctccggggactccatgttgagcaattccgacacttggaattggatta gacaaagcccgtcccggggtctggaatggttgggacgcacctaccaccggtctacttg gtacgacgactacgcgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaacgtggacacctcc aagaaccagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcctgaggatacgggcgtctacta ctgcgcccgcgtccgcctgcaagacgggaacagctggagcgatgcattcgatgtctg gggccagggaactatggtcaccgtgtcgtctgggggcggtggatcgggtggcgggg gttcgggggcggcggctctcagtccgctcttacccaaccggcctcagcctcgggga gccccggccagagcgtgaccatttcctgcaccggcacttcatccgacgtgggcggcta caactacgtgtcctggtaccaacagcacccgggaaaggcccccaagctcatgatctac gacgtgtccaacaggccctcgggagtgtccaaccggttctcgggttcgaaatcgggaa

		acacagccagcctgaccatcagcggactgcaggctgaagatgaagccgactactact gctcctcctacacctcgtcatccacgctctacgtgttcggcactggaactcagctgactg tgctg
	285	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWN WIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSIN VDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSW SDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSAL TQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHP GKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
scFv CAR22 в c188	761	Cagtccgctcttacccaaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtgac catttcctgcaccggcacttcatccgacgtgggcggctacaactacgtgtcctggtacc aacagcacccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaacaggccct cgggagtgtccaaccggttctcgggttcgaaatcgggaaacacagccagcctgaccat cagcggactgcaggctgaagatgaagccgactactactgctcctcctacacctcgtcat ccacgctctacgtgttcggcactggaactcagctgactgtgctgggcggaggaggctc cgaagtgcagcttcaacaatcaggaccaggactcgtcaaaccatcacagaccctctcc ctcacatgtgccatctccggggactccatgttgagcaattccgacacttggaattggatta gacaaagcccgtcccggggtctggaatggttgggacgcacctaccaccggtctacttg gtacgacgactacgcgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaacgtggacacctcc aagaaccagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcctgaggatacgggcgtctacta ctgcgcccgcgtccgcctgcaagacgggaacagctggagcgatgcattcgatgtctg ggccagggaactatggtcaccgtgtcgtct
	762	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWY QQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGG GSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSI NVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNS WSDAFDVWGQGTMVTVSS
scFv CAR22 в c224	763	cagtccgctctgactcagccggcctcagcttcggggtcccctggtcaaagcgtcactat ttcctgtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctggtaccaac agcaccccggaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggccgtcagg agtgtccaacagattctccggctccaagagcggaaacactgccagcttgaccattagc ggcttgcaggccgaggacgaagccgactactactgctctagctacacatcctcgtctac

		cctctacgtgtttggaacggggacccagctgactgtgctcgggggtggaggatcagag gtgcaactccagcagtccggtcctggcctcgtgaaaccgtcccaaaccctgtccctga cttgcgccatctcgggcgactccatgctgtccaattccgacacctggaactggattaga caatcgcctagccggggactcgaatggctgggccggacctaccaccggtccacgtgg tatgacgactacgcaagctccgtccggggaagggtgtccattaacgtcgatacctccaa gaaccagtacagccttcagctgaacgctgtgacccccgaggataccggcgtctactac tgtgcaagagtgcgattgcaggatggaaactcgtggtcggacgcattcgatgtctggg gacagggaactatggtgaccgtgtcctcg
	762	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWY QQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGG GSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSI NVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNS WSDAFDVWGQGTMVTVSS
scFv CAR22 в с227	764	cagtccgctctgactcagccggcctcagcttcggggtcccctggtcaaagcgtcactat ttcctgtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctggtaccaac agcaccccggaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggccgtcagg agtgtccaacagattctccggctccaagagcggaaacactgccagcttgaccattagc ggcttgcaggccgaggacgaagccgactactactgctctagctacacatcctcgtctac cctctacgtgtttggaacggggacccagctgactgtgctcgggggtggaggatcagag gtgcaactccagcagtccggtcctggcctcgtgaaaccgtcccaaaccctgtccctga cttgcgccatctcgggcgactccatgctgtccaattccgacacctggaactggattaga caatcgcctagccggggactcgaatggctgggccggacctaccaccggtccacgtgg tatgacgactacgcaagctccgtccggggaagggtgtccattaacgtcgatacctccaa gaaccagtacagccttcagctgaacgctgtgacccccgaggataccggcgtctactac tgtgcaagagtgcgattgcaggatggaaactcgtggtcggacgcattcgatgtctggg gacagggaactatggtcactgtgtcctcc
	762	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWY QQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGG GSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSI NVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNS WSDAFDVWGQGTMVTVSS

В таблице 33 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности дополнительных компонентов CAR, например, сигнального пептида, линкеров и сайтов P2A, которые могут использоваться в молекуле CAR, например, в молекуле двойного CAR, описанной в данном документе (например, молекуле двойного CAR, содержащей (i) первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) второй CAR, который связывается с CD19).

Таблица 33. Дополнительные компоненты CAR

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
Сигнальный пептид CAR22 в c201, c203 и тандемных CAR c171, c182, c188	199	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc
	1	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид в тандемных CAR c224, c227	765	atggccctgcccgtgactgcgctcctgcttccgttggccctgctcctgcatgccgccagacct
	1	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид CAR19 в c201 и c203	766	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccg
	1	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид CAR22 в c230	767	atggcacttcccgtcaccgccctgctgctcccactcgccctccttctgcacgccgcccgcccc
	1	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид CAR19 в c230	768	atggccctgccagtgaccgcgctcctgctgcccctggctctgctgcttcacgcggcccggcct
	1	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Шарнирный и трансмембранный домены CD8 CAR22 в c201 и c203 и в тандемных CAR c171, c182, c188,	769	accactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccgggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt
	202	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

c224, c227		
Шарнирный и трансмембранный домены CD8 CAR22 в c230	770	actaccaccccggccccgcggccccctacaccggcaccgactattgccagccagcct ctctcgctgcggccggaggcctgccgcccagccgccggcggagccgtgcacaccc gcggtctggacttcgcgtgcgatatctacatctgggctccgctggccgggacttgtggc gtgctgctgctgtctctggtcatcacactgtactgc
	202	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
Шарнирный и трансмембранный домены CD8 CAR19 в c201 и c203	771	accacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagc ccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacac gaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtg gggtccttctcctgtcactggttatcacccctttactgc
	202	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
Шарнирный и трансмембранный домены CD8 CAR19 в c230	772	accaccacccctgcgcctcggcctcctaccccggctcccactatcgcgagccagccg ctgagcctgcggcctgaggcttgccgaccggccgctggcggcgccgtgcatactcgg ggcctcgactttgcctgtgacatctacatctgggcccccctggccggaacgtgcggagt gctgctgctgtcgctggtcattaccctgtattgc
	202	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
4-1BB CAR22 в c201 и c203 и в тандемных CAR c171, c182, c188, c224, c227	773	aagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcg gctgcgaactg
	7	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL
4-1BB CAR19 в c201 и c203	18	aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtaca aactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggagg atgtgaactg
	7	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL
4-1BB CAR22 в c230	774	aagcgcggaagaaagaagctgctctacatcttcaagcaacccttcatgcggcctgtgc agaccacccaggaagaggatggctgctcctgccggttcccggaggaagaagagggc ggatgcgaactg
	7	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG

		GCEL
4-1BB CAR19 в c230	775	aaacgcggaaggaagaagctgttgtacattttcaagcagcccttcatgcgcccggtgc aaactactcaggaggaagatggctgttcctgtcggttccccgaagaggaagaaggcg gctgcgagttg
	7	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL
CD3-дзета CAR22 в c201 и c203 и в тандемных CAR 171, c182, c188, c224, c227	776	cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaaga gggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgg tatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactc agcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
	10	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
CD3-дзета CAR19 в c201 и c203	21	agagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaacc agctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagag acgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaa ggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattggg atgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcag tacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc
	10	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
CD3-дзета CAR22 в c230	777	cgcgtgaagttcagccgaagcgccgacgccccggcctaccagcagggccagaacc aactgtacaacgaactcaacctgggtcggagagaagagtacgacgtgctggacaaaa gacgcggcagggaccccgagatgggcggaaagcctcgccgcaagaacccgcagg agggcctctacaacgagctgcagaaggacaagatggccgaagcctactcagagatc ggcatgaaggggagcggaggcgcgggaagggccacgacggtttgtaccaaggac tttccactgcgaccaaggacacctacgatgccctccatatgcaagccctgccgccccg g
	10	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK

		RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
CD3-дзета CAR19 в c230	778	agggtcaagttctcccggtccgccgatgctcccgcctaccaacaggggcagaaccag ctttataacgaactgaacctgggcaggagggaggaatatgatgtgttggataagcgcc ggggccgggacccagaaatgggggaaagcccagaagaaagaaccctcaagagg gactttacaacgaattgcagaaagacaaaatggccgaggcctactccgagattgggat gaagggcgaaagacggagaggaaaggggcacgacgggctctaccagggactcag caccgccaccaaagatacctacgacgccctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc
	10	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
Линкер между scFv в c171	779	ttggcagaagccgccgcgaaa
	308	LAEAAAK
Линкер между scFv в c182, c188	780	ggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagc
	104	GGGGSGGGGSGGGGS
Линкер между scFv в c224	781	ggcggaggcgggagcggaggaggaggctctggcggaggaggaagc
	104	GGGGSGGGGSGGGGS
Линкер между scFv в c227	782	ggcggtggaggctcgggggggggcggctcaggaggaggcggctca
	104	GGGGSGGGGSGGGGS
P2A в c201, c203	783	ggaagcggagctactaacttcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaa ccctggacct
	784	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
P2A в c230	785	ggttccggagctaccaacttctcgctgttgaagcaggccggagatgtcgaggaaaacc cgggacct
	784	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
Линкер Gly4Ser	786	Ggtggaggtggcagc
	25	GGGGS

В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, содержит первый CAR, который нацеливается на первый антиген и содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий костимулирующий сигнальный домен, а не первичный сигнальный домен, и второй CAR, который нацеливается на второй, другой, антиген и содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий первичный сигнальный домен, а

не костимулирующий сигнальный домен. Размещение костимулирующего сигнального домена, например, 4-1BB, CD28, CD27, OX-40 или ICOS, в первом CAR и первичного сигнального домена, например, CD3-дзета, во втором CAR может ограничивать активность CAR клетками, в которых экспрессируются обе мишени. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, содержит первый CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и костимулирующий домен, и второй CAR, который нацеливается на другой антиген и содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, содержит первый CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен, и второй CAR, который нацеливается на другой антиген и содержит антигенсвязывающий домен для антигена, трансмембранный домен и костимулирующий сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, содержит XCAR, описанный в данном документе, и ингибирующий CAR. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, обнаруживаемым на нормальных клетках, но не на раковых клетках, например, на нормальных клетках, которые также экспрессируют X. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен ингибирующей молекулы. Например, внутриклеточный домен ингибирующего CAR может представлять собой внутриклеточный домен PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекулы MHC I класса, молекулы MHC II класса, GAL9, аденозина и TGF (например, TGF-бета).

В некоторых вариантах осуществления в случае, если клетка, экспрессирующая CAR, содержит два или более различных CAR, то антигенсвязывающие домены различных CAR могут быть такими, что антигенсвязывающие домены не взаимодействуют друг с другом. Например, клетка, экспрессирующая первый и второй CAR, может иметь антигенсвязывающий домен первого CAR, например, в качестве фрагмента, например, scFv, который не ассоциирует с антигенсвязывающим доменом второго CAR, например, антигенсвязывающий домен второго CAR представляет собой VHH.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит однодоменные антигенсвязывающие (SDAB) молекулы, в том числе молекулы, в которых определяющие комплементарность области являются частью однодоменного полипептида. Примеры включают без ограничения вариабельные домены тяжелых цепей, связывающие молекулы, в природных условиях лишенные легких цепей, отдельные домены, полученные из традиционных 4-цепочечных антител, сконструированные

домены и однодоменные каркасные структуры, отличные от полученных из антител. Молекулы SDAB могут являться любыми молекулами, известными из уровня техники, или любыми однодоменными молекулами, которые будут известны в будущем. Молекулы SDAB могут быть получены из любых видов, в том числе без ограничения из мыши, человека, верблюда, ламы, миноги, рыбы, акулы, козы, кролика и быка. Этот термин также охватывает встречающиеся в природе молекулы однодоменных антител из видов, отличных от Camelidae и акул.

В некоторых вариантах осуществления молекула SDAB может быть получена из вариабельной области иммуноглобулина, обнаруживаемого у рыб, как, например, та, которая получена из изотипа иммуноглобулина, известного как новый антигенный рецептор (NAR), обнаруживаемого в сыворотке крови акулы. Способы получения однодоменных молекул, получаемых из вариабельной области NAR ("IgNAR"), описаны в WO 03/014161 и Streltsov (2005) Protein Sci. 14:2901-2909.

В некоторых вариантах осуществления молекула SDAB представляет собой встречающуюся в природе однодоменную антигенсвязывающую молекулу, известную как тяжелая цепь, лишенная легких цепей. Такие однодоменные молекулы раскрыты, например, в WO 9404678 и Hamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448. В целях ясности этот вариабельный домен, полученный из молекулы тяжелой цепи, в природных условиях лишенной легкой цепи, именуется в данном документе как VHH или нанотело, чтобы отличать его от традиционного VH четырехцепочечных иммуноглобулинов. Такая молекула VHH может быть получена из видов Camelidae, например, из верблюда, ламы, дромадера, альпаки и гуанако. Другие виды, помимо Camelidae, могут продуцировать молекулы тяжелых цепей, в природных условиях лишенные легкой цепи; такие VHH входят в объем настоящего изобретения.

Молекулы SDAB могут быть рекомбинантными, с пересаженными CDR, гуманизированными, камелизированными, деиммунизированными и/или образованными in vitro (например, отобранными с помощью фагового дисплея).

Также было обнаружено, что в клетках, имеющих множество химерных рецепторов, встроенных в мембрану, содержащих антигенсвязывающий домен, взаимодействия между антигенсвязывающими доменами рецепторов могут быть нежелательными, например, поскольку они ингибируют способность одного или нескольких антигенсвязывающих доменов связываться с их когнатными антигенами. Соответственно, в данном документе раскрыты клетки, имеющие первый и второй не встречающиеся в природе химерные рецепторы, встроенные в мембрану, содержащие антигенсвязывающие домены, для которых сведены к минимуму такие взаимодействия. Также в данном документе раскрыты нуклеиновые кислоты, кодирующие первый и второй не встречающиеся в природе химерные рецепторы, встроенные в мембрану, содержащие антигенсвязывающие домены, для которых сведены к минимуму такие взаимодействия, а также способы получения и применения таких клеток и нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из

первого и второго не встречающихся в природе химерных рецепторов, встроенных в мембрану, содержит scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюдовых, акулы или миноги или одиночный VH-домен, полученный из последовательности человека или мыши.

В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит первый и второй CAR, где антигенсвязывающий домен одного из первого и второго CAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из первого и второго CAR представляет собой scFv, а другой не представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из первого и второго CAR содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюдовых, акулы или миноги или одиночный VH-домен, полученный из последовательности человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из первого и второго CAR содержит нанотело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из первого и второго CAR содержит VHH-домен верблюдовых.

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

В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена первого CAR при наличии его на поверхности клетки со своим когнатным антигеном существенно не снижается благодаря наличию второго CAR. В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена первого CAR со своим когнатным антигеном в присутствии второго CAR составляет по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, например, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, от связывания антигенсвязывающего домена первого CAR со своим когнатным антигеном в отсутствие второго CAR.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены первого и второго CAR при наличии их на поверхности клетки ассоциируют друг с другом в меньшей степени, чем в случае, если бы они оба являлись антигенсвязывающими scFv-доменами. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены первого и второго CAR ассоциируют друг с другом в степени, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшей, например, на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньшей, чем в случае, если бы они оба являлись антигенсвязывающими scFv-доменами.

Совместная экспрессия средства, усиливающего активность CAR

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, может дополнительно экспрессировать другое средство, например, средство, усиливающее активность или приспособленность клетки, экспрессирующей CAR.

Например, в некоторых вариантах осуществления данное средство может представлять собой средство, ингибирующее молекулу, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию. В некоторых вариантах осуществления молекула, которая модулирует или регулирует Т-клеточную функцию, представляет собой ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, PD1, в некоторых вариантах осуществления могут снижать способность клеток, экспрессирующих CAR, осуществлять иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекулу MHC I класса, молекулу MHC II класса, GAL9, аденозин или TGF-бета.

В ряде вариантов осуществления средство, например, ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, dsRNA, например, siRNA или shRNA; или, например, ингибирующие белок или систему, например, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или эндонуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), например, описанные в данном документе, можно применять для ингибирования экспрессии молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию в клетке, экспрессирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой shRNA, например, shRNA, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления средство, которое модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, ингибируется в клетке, экспрессирующей CAR. Например, молекула dsRNA, ингибирующая экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, Т-клеточную функцию, связана с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, ассоциированный со вторым полипептидом, который обеспечивает положительный сигнал для клетки, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления средство содержит первый полипептид, например, из ингибирующей молекулы, такой как PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекула MHC I класса, молекула MHC II класса, GAL9, аденозин или TGF-бета или фрагмент любого из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любого из них), и второй

полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, содержащий костимулирующий домен (например, 4-1BB, CD27 или CD28, например, описанные в данном документе) и/или первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе). В некоторых вариантах осуществления средство содержит первый полипептид из PD1 или его фрагмента (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1) и второй полипептид, представляющий собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, сигнальный домен CD28, описанный в данном документе, и/или сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе). PD1 является ингибирующим представителем семейства рецепторов CD28, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных B-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Было показано, что два лиганда PD1 - PD-L1 и PD-L2 - подавляют активацию Т-клеток при связывании с PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 является широко распространенным при различных формах рака у человека (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). Иммуносупрессию можно устранить путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления средство, содержащее внеклеточный домен (ECD) ингибирующей молекулы, например, белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD1), может быть слито с трансмембранным доменом и внутриклеточными сигнальными доменами, такими как 4-1BB и CD3-дзета (также называется в данном документе CAR на основе PD1). В некоторых вариантах осуществления CAR на основе PD1 при применении в комбинациях с XCAR, описанным в данном документе, улучшает персистенцию Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR на основе PD1, содержащий внеклеточный домен PD1, указанный подчеркиванием в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления CAR на основе PD1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления CAR на основе PD1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления средство содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR на основе PD1, например, CAR на основе PD1, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты для CAR на основе PD1 представлена под SEQ ID NO: 23, при этом ECD PD1 подчеркнут.

В другом примере в некоторых вариантах осуществления средство, которое усиливает активность клетки, экспрессирующей CAR, может представлять собой костимулирующую молекулу или лиганд костимулирующей молекулы. Примеры костимулирующих молекул включают молекулу MHC I класса, BTLA и лиганд Toll-

подобного рецептора, а также OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137). Дополнительные примеры таких костимулирующих молекул включают CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфично связывается с CD83, например, описанные в данном документе. Примеры лигандов костимулирующих молекул включают CD80, CD86, CD40L, ICOSL, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL и LIGHT. В ряде вариантов осуществления лиганд костимулирующей молекулы является лигандом костимулирующей молекулы, отличной от костимулирующей молекулы, домен которой используется в CAR. В ряде вариантов осуществления лиганд костимулирующей молекулы является лигандом той же костимулирующей молекулы, что и костимулирующая молекула, домен которой используется в CAR. В некоторых вариантах осуществления лиганд костимулирующей молекулы представляет собой 4-1BBL. В одном варианте осуществления лиганд костимулирующей молекулы представляет собой CD80 или CD86. В некоторых вариантах осуществления лиганд костимулирующей молекулы представляет собой CD70. В ряде вариантов осуществления описанная в данном документе иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, может быть дополнительно сконструирована таким образом, чтобы она экспрессировала одну или несколько дополнительных костимулирующих молекул или лигандов костимулирующих молекул.

shRNA для TET2

Например, в некоторых вариантах осуществления средство может представлять собой средство, которое ингибирует экспрессию мишени, усиливающей CAR-T-клеточную функцию - например, путем (i) усиления пролиферации и/или (ii) регуляции эффекторной функции посредством регуляции продуцирования цитокинов и/или дегрануляции. В некоторых вариантах осуществления средство, например, ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, dsRNA, например, siRNA или shRNA; или, например, ингибирующие белок или систему, например, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или эндонуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), например, описанные в данном документе, можно применять для ингибирования экспрессии мишени, которая усиливает CAR-T-клеточную функцию. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой Tet2. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой shRNA, например, shRNA, которая

целенаправленно воздействует на Tet2, содержащую смысловую нить, которая содержит последовательность-мишень Tet2, и антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично. В некоторых вариантах осуществления shRNA закодирована в векторе; при этом данный вектор может являться таким же, как вектор, кодирующий CAR, раскрытый в данном документе, или отличаться от него. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий shRNA, содержит промотор, смысловую нить, содержащую последовательность-мишень Tet2, петлю, антисмысловую нить, комплементарную смысловой нити полностью или частично, и необязательно поли(T)-хвост. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор U6, необязательно промотор U6 человека. Последовательности и способы применения промоторов U6 для shRNA известны из уровня техники, и их можно найти, например, в Gao et al. Transcription, 8(5):275-287, 2017; Kunkel & Pederson, Genes & Dev 2:196-204, 1988; Goomer & Kunkel Nucleic Acid Res. 20:4903-4912, 1992; и Ma et al, Molecular Therapy-Nucleic Acids 3:e161, 2014, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры последовательностей промоторов U6 (с подчеркнутым TATA-боксом) включают:

TATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (SEQ ID NO: 787)

TATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG (SEQ ID NO: 788)

TTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (SEQ ID NO: 789)

TTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCA (SEQ ID NO: 790)

TTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG (SEQ ID NO: 791)

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить, содержащая последовательность-мишень Tet2, содержит 19, 20 или 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить, комплементарная смысловой нити полностью или частично, содержит 19, 20 или 21 нуклеотид и необязательно имеет такую же длину, как и смысловая нить. В некоторых вариантах осуществления комплементарная антисмысловая нить является комплементарной (при прочитывании в направлении 3'-5') смысловой нити, содержащей последовательность-мишень Tet2, частично, например, от по меньшей мере положений 2-18 или от положений 1-9 и 11 до 19, 20 или 21. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить, комплементарная смысловой нити, содержащей последовательность-мишень Tet2, является комплементарной (при прочитывании в направлении 3'-5') смысловой нити, содержащей последовательность-мишень Tet2, полностью, т. е. по всей длине смысловой нити, содержащей последовательность-мишень Tet2, например, в положениях 1-19, 1-20 или 1-21. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит одну или несколько последовательностей-мишеней Tet2, представленных в таблице 4 в WO2017/049166, включенной в данный документ посредством ссылки. Неограничивающие иллюстративные последовательности-мишени Tet2 включают:
GGGTAAGCCAAGAAAGAAA (SEQ ID NO: 418)

TTTCTTTCTTGGCTTACCC (SEQ ID NO: 419)

Антисмысловая нить, являющаяся обратно комплементарной по отношению к SEQ ID NO: 418, представлена выше под SEQ ID NO: 419, хотя следует отметить, что ее определение можно без труда произвести с использованием навыков в данной области техники (например, с помощью Sequence Manipulation Site, доступного на bioinformations.org/sms2/rev_comp.html). В некоторых вариантах осуществления петля выбрана из последовательностей, известных из уровня техники, как, например, без ограничения, тех, которые раскрыты в Bofill-De Ros & Gu, Methods 103: 157-166, 2016; Gu et al. Cell 151(4): 900-911, 2012; Cullen, Gene Ther.13:503-508, 2006; и Schopman et al. Antiviral Res. 86:204-211, 2014, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. Неограничивающие иллюстративные последовательности петли включают:

GTTAATATTCATAGC (SEQ ID NO: 792)

CCTGACCCA (SEQ ID NO: 793)

В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий shRNA, содержит поли(Т)-хвост, т. е. 2, 3, 4, 5, 6 или больше нуклеотидов Т в последовательности, например: TT, TTT, TTTT, TTTTT, TTTTTT, TTTTTT, TTTTTTT, TTTTTTTTT, TTTTTTTTT и т. д. Неограничивающие иллюстративные последовательности, содержащие все элементы вектора, описанные в данном абзаце, включают следующие.

Таблица 29

Промотор	**Смысловая нить**	**Петля**	**Антисмысловая нить**	**Поли(Т)**
TATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG (SEQ ID NO: 788)	GGGTAAGCCAAGAAAGAAA (SEQ ID NO: 418)	GTTAATATTCATAGC (SEQ ID NO: 792)	TTTCTTTCTTGGCTTACCC (SEQ ID NO: 419)	TTTTTT
TATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG (SEQ ID NO: 788)	GGGTAAGCCAAGAAAGAAA (SEQ ID NO: 418)	CCTGACCCA (SEQ ID NO: 793)	TTTCTTTCTTGGCTTACCC (SEQ ID NO: 419)	TTTTTT
TTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCA (SEQ ID NO: 790)	GGGTAAGCCAAGAAAGAAA (SEQ ID NO: 418)	GTTAATATTCATAGC (SEQ ID NO: 792)	TTTCTTTCTTGGCTTACCC (SEQ ID NO: 419)	TTTTTT
TTATATATCTTGTGGAAAGGA	GGGTAAGCCAAGAAAGAAA	CCTGACCCA (SEQ ID NO:	TTTCTTTCTTGGCTTACCC (SEQ ID	TTTTTT

CGAAACACCA (SEQ ID NO: 790)	(SEQ ID NO: 418)	793)	NO: 419)	
TTATATATCTT GTGGAAAGGA CGAAACACCG (SEQ ID NO: 791)	GGGTAAGCCAA GAAAGAAA (SEQ ID NO: 418)	GTTAATATT CATAGC (SEQ ID NO: 792)	TTTCTTTCTTGGC TTACCC (SEQ ID NO: 419)	TTTTTT
TTATATATCTT GTGGAAAGGA CGAAACACCG (SEQ ID NO: 791)	GGGTAAGCCAA GAAAGAAA (SEQ ID NO: 418)	CCTGACCCA (SEQ ID NO: 793)	TTTCTTTCTTGGC TTACCC (SEQ ID NO: 419)	TTTTTT

Понятно, что специалист средней квалификации в данной области без труда может транскрибировать последовательности ДНК, раскрытые в данном документе, которые относятся к вектору, кодирующему shRNA, в РНК путем замещения "T" на "U" с получением таким образом последовательности shRNA. В некоторых вариантах осуществления shRNA или вектор, кодирующий shRNA, применяют на стадии (ii) (т. е. стадии приведения в контакт) способа получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), раскрытый в данном документе выше. Соответственно, стадия (ii) может дополнительно включать приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с shRNA, необязательно вектором, кодирующим shRNA, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий shRNA, дополнительно содержит выявляемую метку, т. е. метку, которая может быть выявлена в клетках, приводимых в контакт с вектором, что указывает на успешную трансдукцию. Известны неограничивающие примеры таких выявляемых меток, такие как, без ограничения, флуоресцентные метки и/или искусственные поверхностные маркеры, необязательно выявляемые с помощью коммерчески доступных антител или других молекул. Дополнительные неограничивающие примеры включают искусственные поверхностные маркеры, такие как усеченный EGFR или биотин/стрептавидин; такие метки хорошо известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий shRNA, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, раскрытый в данном документе выше, и применяется на стадии (ii) (т. е. стадии приведения в контакт) способа получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), раскрытый в данном документе выше.

Совместная экспрессия CAR с рецептором хемокина

В ряде вариантов осуществления описанная в данном документе клетка,

экспрессирующая CAR, например, клетка, экспрессирующая CAR для CD19, дополнительно содержит молекулу рецептора хемокина. Трансгенная экспрессия рецепторов хемокинов CCR2b или CXCR2 в Т-клетках усиливает их миграцию к солидным опухолям, секретирующим CCL2 или CXCL1, в том числе к меланоме и нейробластоме (Craddock et al., J Immunother. 2010 Oct; 33(8):780-8; и Kershaw et al., Hum Gene Ther. 2002 Nov 1; 13(16):1971-80). Таким образом, не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что рецепторы хемокинов, экспрессируемые в клетках, экспрессирующих CAR, которые распознают хемокины, секретируемые опухолями, например, солидными опухолями, могут улучшать "хоминг" клетки, экспрессирующей CAR, в опухоль, содействовать инфильтрации клетки, экспрессирующей CAR, в опухоль и усиливать противоопухолевую эффективность клетки, экспрессирующей CAR. Молекула рецептора хемокина может содержать встречающийся в природе или рекомбинантный рецептор хемокина или его хемокинсвязывающий фрагмент. Молекула рецептора хемокина, подходящая для экспрессии в клетке, экспрессирующей CAR (например, CAR-Tx), описанной в данном документе, включает рецептор хемокина CXC (например, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 или CXCR7), рецептор хемокина CC (например, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 или CCR11), рецептор хемокина CX3C (например, CX3CR1), рецептор хемокина XC (например, XCR1) или их хемокинсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления молекулу рецептора хемокина, которая должна экспрессироваться вместе с CAR, описанным в данном документе, выбирают с учетом хемокина(хемокинов), секретируемых опухолью. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, дополнительно содержит, например, экспрессирует, рецептор CCR2b или рецептор CXCR2. В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, и молекула рецептора хемокина находятся в одном и том же векторе или находятся в двух разных векторах. В ряде вариантов осуществления, в которых CAR, описанный в данном документе, и молекула рецептора хемокина находятся в одном и том же векторе, CAR и молекула рецептора хемокина находятся под контролем двух разных промоторов или находятся под контролем одного и того же промотора.

Конструкции нуклеиновых кислот, кодирующие CAR

В настоящем изобретении также предусмотрена иммунная эффекторная клетка, например, полученная посредством способа, описанного в данном документе, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или несколько конструкций CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представлена в виде транскрипта, представляющего собой матричную РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представлена в виде ДНК-конструкции.

Молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в данном документе, могут представлять собой молекулу ДНК, молекулу РНК или их комбинацию. В некоторых

вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК, кодирующую полипептид CAR, описанный в данном документе. В других вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор, который содержит любую из вышеуказанных молекул нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR по настоящему изобретению (например, scFv) кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, последовательность которой была кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления целая конструкция CAR по настоящему изобретению кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, целая последовательность которой была кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего. Оптимизация кодонов относится к обнаружению того, что частота встречаемости синонимичных кодонов (т. е. кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту) в кодирующей ДНК смещена у разных видов. Такая вырожденность кодонов обеспечивает возможность кодирования идентичного полипептида различными нуклеотидными последовательностями. Из уровня техники известны различные способы оптимизации кодонов, и они включают, например, способы, раскрытые по меньшей мере в патентах США №№ 5786464 и 6114148.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, например, полученная посредством способа, описанного в данном документе, содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с опухолевым антигеном, описанным в данном документе, трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, описанный в данном документе) и внутриклеточный сигнальный домен (например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе), содержащий стимулирующий домен, например, костимулирующий сигнальный домен (например, костимулирующий сигнальный домен, описанный в данном документе), и/или первичный сигнальный домен (например, первичный сигнальный домен, описанный в данном документе, например, дзета-цепь, описанную в данном документе).

В настоящем изобретении также предусмотрены векторы, в которые вставлена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, например, молекула нуклеиновой кислоты, описанная в данном документе. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом по сравнению с векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, заключающимся в том, что ими можно трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности. Ретровирусный вектор также может представлять собой, например, гамма-ретровирусный вектор. Гамма-

ретровирусный вектор может содержать, например, промотор, сигнал упаковки (ψ), сайт связывания праймера (PBS), один или несколько (например, два) длинных концевых повторов (LTR) и трансген, представляющий интерес, например, ген, кодирующий CAR. В гамма-ретровирусном векторе могут отсутствовать структурные гены вирусов, такие как gag, pol и env. Иллюстративные гамма-ретровирусные векторы включают вирус лейкоза мышей (MLV), вирус некроза селезенки (SFFV) и вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV), а также векторы, полученные из них. Другие гамма-ретровирусные векторы описаны, например, в Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713.

В некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую требуемый CAR, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В некоторых вариантах осуществления экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, можно достичь с помощью транспозонов, таких как "спящая красавица", CRISPR, CAS9 и нуклеазы с "цинковыми пальцами". См. ниже June et al. 2009Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716, включенную в данный документ посредством ссылки.

Вкратце, экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, как правило, достигается путем образования функциональной связи нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его части, с промотором и включения конструкции в состав экспрессионного вектора. Векторы могут подходить для репликации и интеграции у эукариот. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, применимые для регуляции экспрессии необходимой последовательности нуклеиновой кислоты.

Нуклеиновую кислоту можно клонировать в векторы множества типов. Например, нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, включающий без ограничения плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животных и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают экспрессионные векторы, репликационные векторы, векторы для образования зондов и векторы для секвенирования.

Кроме того, экспрессионный вектор может предоставляться клетке в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна из уровня техники и описана, например, в Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, тома 1-4, Cold Spring Harbor Press, Нью-Йорк, и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, применимые в качестве векторов, включают без ограничения ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую в по меньшей мере одном организме, промоторную последовательность, подходящие сайты для эндонуклеаз рестрикции и один или несколько селектируемых маркеров (например, из WO 01/96584; WO 01/29058 и патента США № 6326193).

Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан целый ряд систем на

основе вирусов. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно вставить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы с помощью методик, известных из уровня техники. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и доставить в клетки субъекта in vivo либо ex vivo. Из уровня техники известен целый ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления применяются аденовирусные векторы. Из уровня техники известен целый ряд аденовирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления применяются лентивирусные векторы.

Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, регулируют частоту начала транскрипции. Как правило, они расположены в области на 30-110 п. о. выше сайта начала транскрипции, хотя было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта начала транскрипции. Расстояние между промоторными элементами часто является гибким, так что промоторная функция сохраняется при инверсии элементов или их перемещении друг относительно друга. В промоторе гена тимидинкиназы (tk) расстояние между промоторными элементами можно увеличить до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать для активации транскрипции совместно либо независимо. Иллюстративные промоторы включают промоторы генов IE CMV, EF-1α, убиквитина C или фосфоглицераткиназы (PGK).

Примером промотора, который способен обеспечивать экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в Т-клетке млекопитающего, является промотор EF1a. Нативный промотор EF1a управляет экспрессией альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментативную доставку аминоацил-тРНК к рибосоме. Промотор EF1a широко использовался в экспрессионных плазмидах для млекопитающих, и было показано, что он эффективно управляет экспрессией CAR с молекул нуклеиновой кислоты, клонированных в лентивирусный вектор. См., например, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). В некоторых вариантах осуществления промотор EF1a содержит последовательность, представленную в примерах.

Другим примером промотора является последовательность немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность является последовательностью сильного конститутивного промотора, способного управлять экспрессией любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней, на высоких уровнях. Однако можно также использовать последовательности других конститутивных промоторов, в том числе без ограничения раннего промотора вируса обезьян 40 (SV40), промотора вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотора длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (HIV), промотора MoMuLV, промотора вируса лейкоза птиц, немедленно-раннего промотора вируса Эпштейна-Барр, промотора вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, без ограничения, промотор гена актина, промотор гена миозина, промотор гена фактора элонгации-1α, промотор гена гемоглобина и промотор гена

креатинкиназы. Кроме того, настоящее изобретение не должно ограничиваться использованием конститутивных промоторов. Индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Использование индуцируемого промотора обеспечивает наличие молекулярного переключателя, способного включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, если такая экспрессия требуется, или отключать экспрессию, если экспрессия не требуется. Примеры индуцируемых промоторов включают без ограничения металлотионеин-индуцируемый промотор, глюкокортикоид-индуцируемый промотор, прогестерон-индуцируемый промотор и тетрациклин-индуцируемый промотор.

Другим примером промотора является промотор гена фосфоглицераткиназы (PGK). В ряде вариантов осуществления может быть необходим усеченный промотор гена PGK (например, промотор гена PGK с одной или несколькими, например, 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300 или 400, делециями нуклеотидов по сравнению с последовательностью промотора гена PGK дикого типа).

Нуклеотидные последовательности иллюстративных промоторов гена PGK представлены ниже.

Промотор гена PGK WT:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGC
GAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATG
GCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCG
GGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG
AGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAG
TGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCCTT
CGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCC
TGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCTTGGTGCGG
GTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGT
TGGGGCACCATAAGCT (SEQ ID NO: 190)

Иллюстративные усеченные промоторы гена PGK:

PGK100:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGC
GAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATG
GCGGGGTG (SEQ ID NO: 198)

PGK200:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGC
GAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATG
GCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCG
GGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG
(SEQ ID NO: 191)

PGK300:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGC

GAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATG
GCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCG
GGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG
AGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAG
TGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCG (SEQ ID NO: 192)

PGK400:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGC
GAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATG
GCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCG
GGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG
AGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAG
TGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCCTT
CGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCC
TGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG (SEQ ID NO: 193)

Вектор также может содержать, например, сигнальную последовательность, содействующую секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (например, из гена бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий возможность эписомальной репликации и репликации у прокариот (например, точку начала репликации SV40 и ColE1 или другие, известные из уровня техники), и/или элементы для обеспечения возможности осуществления отбора (например, ген устойчивости к ампициллину и/или маркер устойчивости к зеоцину).

Для оценки экспрессии полипептида CAR или его частей экспрессионный вектор, который должен быть введен в клетку, также может содержать селектируемый маркерный ген или репортерный ген либо их оба для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, в отношении которых стремились провести трансфекцию или инфицирование посредством вирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления селектируемый маркер может переноситься на отдельном фрагменте ДНК и использоваться в процедуре котрансфекции. Как селектируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Применимые селектируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как neo и т. п.

Репортерные гены используют для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценивания функциональных свойств регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который отсутствует или не экспрессируется в организме- или ткани-реципиенте и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется в некотором легко выявляемом свойстве, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие

репортерные гены 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 помощью известных методик или приобретены коммерческим путем. Как правило, конструкцию с минимальной 5'-фланкирующей областью, демонстрирующую наивысший уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируют как промотор. Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценивания средств в отношении способности к модулированию транскрипции, управляемой промотором.

В ряде вариантов осуществления вектор может содержать две или более последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR, например, CAR, описанный в данном документе, например, CAR для CD19, и второй CAR, например, ингибирующий CAR или CAR, который специфично связывается с антигеном, отличным от CD19. В таких вариантах осуществления две или более последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR, кодируются одной молекулой нуклеиновой кислоты в одной и той же рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления два или более CAR могут, например, быть разделены одним или несколькими сайтами расщепления пептидов (например, сайтом саморасщепления или субстратом для внутриклеточной протеазы). Примеры сайтов расщепления пептидов включают сайты T2A, P2A, E2A или F2A.

Способы введения генов в клетку и обеспечения их экспрессии в ней известны из уровня техники. Что касается экспрессионного вектора, то вектор можно легко ввести в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым способом, например, способом, известным из уровня техники. Например, экспрессионный вектор можно перенести в клетку-хозяина физическим, химическим или биологическим способом.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т. п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны из уровня техники. См., например, Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, тома 1-4, Cold Spring Harbor Press, Нью-Йорк. Подходящим способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция с использованием фосфата кальция.

Биологические способы введения полинуклеотида, представляющего интерес, в клетку-хозяина включают использование векторов на основе ДНК и РНК. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко применяемым способом вставки генов в клетки млекопитающего, например, человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I типа, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. См., например, патенты США

№№ 5350674 и 5585362.

Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы и липидные системы, в том числе эмульсии типа "масло в воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Иллюстративной коллоидной системой для применения в качестве средства для доставки in vitro и in vivo является липосома (например, искусственная мембранная везикула). Из уровня техники доступны другие способы целенаправленной доставки нуклеиновых кислот, такие как доставка полинуклеотидов с помощью нацеливающихся наночастиц или другой подходящей системы доставки субмикронного размера.

В случае использования системы доставки, отличной от вирусной, иллюстративным средством для доставки является липосома. Для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (in vitro, ex vivo или in vivo) предполагается применение липидных составов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть ассоциирована с липидом. Нуклеиновая кислота, ассоциированная с липидом, может быть инкапсулированной в водной внутренней части липосомы, помещенной в липидный бислой липосомы, присоединенной к липосоме посредством связывающей молекулы, которая ассоциирована как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захваченной в липосому, образовывать комплекс с липосомой, быть диспергированной в растворе, содержащем липид, смешанной с липидом, объединенной с липидом, содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться в мицелле или образовывать комплекс с ней или иным образом быть ассоциированной с липидом. Композиции для ассоциации на основе липидов, липидов/ДНК или липидов/экспрессионного вектора не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислойной структуре, в виде мицелл или в "сжатой" структуре. Они также могут быть просто помещены в раствор, при этом по возможности образуют агрегаты, которые не являются однородными по размеру или форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут являться встречающимися в природе или синтетическими липидами. Например, липиды включают жировые капли, которые встречаются в природе в цитоплазме, а также класс соединений, который содержит длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

Подходящие для применения липиды можно получить из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин ("DMPC") можно получить от Sigma, Сент-Луис, Миссури; дицетилфосфат ("DCP") можно получить от K & K Laboratories (Плейнвью, Нью-Йорк); холестерин ("Choi") можно получить от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды можно получить от Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре приблизительно -20°C. Хлороформ используется в качестве единственного растворителя, поскольку он

испаряется легче, чем метанол. "Липосома" является общим термином, охватывающим различные одно- и мультиламеллярные липидные носители, образованные путем формирования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать как имеющие везикулярные структуры с фосфолипидной бислойной мембраной и внутренней водной средой. Мультиламеллярные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются самопроизвольно при суспендировании фосфолипидов в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самореорганизации перед образованием замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991, Glycobiology 5: 505-10). Однако также охватываются композиции, которые в растворе имеют структуры, отличные от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать вид мицеллярной структуры или просто существовать в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предполагаются комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Чтобы подтвердить присутствие последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, можно проводить различные анализы, независимо от способа, применяемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина, или иного воздействия ингибитора по настоящему изобретению на клетку. Такие анализы включают, например, "молекулярно-биологические" анализы, хорошо известные специалистам в данной области, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как выявление присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, с помощью иммунологических способов (ELISA и вестерн-блоттинга) или с помощью описанных в данном документе анализов, для идентификации средств, находящихся в пределах объема настоящего изобретения.

CAR, содержащие рецепторы естественных клеток-киллеров (NKR)

В некоторых вариантах осуществления молекула CAR, описанная в данном документе, содержит один или несколько компонентов рецептора естественных клеток-киллеров (NKR), образуя тем самым NKR-CAR. Компонент NKR может представлять собой трансмембранный домен, шарнирный домен или цитоплазматический домен любого из следующих рецепторов естественных клеток-киллеров: иммуноглобулиноподобного рецептора клеток-киллеров (KIR), например, KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, DIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 и KIR3DP1; рецептора естественной цитотоксичности (NCR), например, NKp30, NKp44, NKp46; семейства рецепторов иммунных клеток, являющихся сигнальными молекулами активации лимфоцитов (SLAM), например, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME и CD2F-10; Fc-рецептора (FcR), например, CD16 и CD64; и рецепторов Ly49, например, LY49A, LY49C. Молекулы NKR-CAR, описанные в данном документе, могут взаимодействовать с адапторной молекулой или внутриклеточным сигнальным доменом, например, DAP12. Иллюстративные конфигурации и последовательности молекул CAR,

содержащих компоненты NKR, описаны в международной публикации № WO2014/145252, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Разделенный CAR

В некоторых вариантах осуществления в клетке, экспрессирующей CAR, используется разделенный CAR. Подход с разделенным CAR более подробно описан в публикациях WO2014/055442 и WO2014/055657. Вкратце, система разделенного CAR содержит клетку, экспрессирующую первый CAR, имеющий первый антигенсвязывающий домен и костимулирующий домен (например, 4-1BB), и эта клетка также экспрессирует второй CAR, имеющий второй антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен (например, CD3-дзета). Когда клетка встречается с первым антигеном, то активируется костимулирующий домен, и клетка пролиферирует. Когда клетка встречается со вторым антигеном, то активируется внутриклеточный сигнальный домен, и запускается активность уничтожения клеток. Таким образом, клетка, экспрессирующая CAR, полностью активируется только в присутствии обоих антигенов.

Стратегии регуляции химерных антигенных рецепторов

В некоторых вариантах осуществления регулируемый CAR (RCAR), в котором можно контролировать активность CAR, является желательным для оптимизации безопасности и эффективности средства CAR-терапии. Существует множество путей, которыми можно регулировать формы активности CAR. Например, индуцибельный апоптоз с использованием, например, каспазы, слитой с доменом димеризации (см., например, Di Stasa et al., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3; 365(18):1673-1683), можно применять в качестве защитного переключателя в CAR-терапии по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетки (например, Т-клетки или NK-клетки), экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, дополнительно содержат индуцируемый переключатель апоптоза, где каспаза человека (например, каспаза 9) или ее модифицированный вариант слиты с модифицированным вариантом белка FKB человека, что обеспечивает условную димеризацию. В присутствии малой молекулы, такой как рапалог (например, AP1903, AP20187), индуцируемая каспаза (например, каспаза 9) активируется и приводит к быстрому апоптозу и гибели клеток (например, Т-клеток или NK-клеток), экспрессирующих CAR по настоящему изобретению. Примеры индуцируемого переключателя апоптоза на основе каспазы (или одного или нескольких аспектов такого переключателя) описаны, например, в US2004040047; US20110286980; US20140255360; WO1997031899; WO2014151960; WO2014164348; WO2014197638; WO2014197638; все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В другом примере клетки, экспрессирующие CAR, могут также экспрессировать молекулу индуцируемой каспазы-9 (iCaspase-9), которая при введении димеризующего лекарственного средства (например, римидуцида (также называемого AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) или AP20187 (Ariad)) приводит к активации каспазы-9 и апоптозу клеток. Молекула iCaspase-9 содержит связывающий домен для химического индуктора димеризации (CID), который опосредует димеризацию в присутствии CID. Это приводит к

индуцируемому и селективному истощению по клеткам, экспрессирующим CAR. В некоторых случаях молекула iCaspase-9 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, отдельной от вектора(векторов), кодирующего(кодирующих) CAR. В некоторых случаях молекула iCaspase-9 кодируется той же молекулой нуклеиновой кислоты, что и вектор, кодирующий CAR. iCaspase-9 может обеспечивать защитное переключение для избежания возможной токсичности клеток, экспрессирующих CAR. См., например, Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; ID клинического испытания № NCT02107963 и Di Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673-83.

Альтернативные стратегии регуляции средства CAR-терапии по настоящему изобретению включают использование малых молекул или антител, которые деактивируют или выключают активность CAR, например, путем удаления клеток, экспрессирующих CAR, например, путем индукции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC). Например, клетки, экспрессирующие CAR, описанные в данном документе, могут также экспрессировать антиген, который распознается молекулами, способными индуцировать гибель клеток, например, ADCC или комплемент-индуцированную гибель клеток. Например, клетки, экспрессирующие CAR, описанные в данном документе, также могут экспрессировать рецептор, на который могут нацеливаться антитело или фрагмент антитела. Примеры таких рецепторов включают EpCAM, VEGFR, интегрины (например, интегрины αvβ3, α4, αI¾β3, α4β7, α5β1, αvβ3, αv), представителей суперсемейства рецепторов TNF (например, TRAIL-R1 , TRAIL-R2), рецептор PDGF, рецептор интерферона, рецептор фолиевой кислоты, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, рецептор IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD1 1, CD1 1 a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/рецептор IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/базиджин, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 и EGFR и их усеченные варианты (например, варианты, в которых сохраняются один или несколько внеклеточных эпитопов, но отсутствуют одна или несколько областей в цитоплазматическом домене).

Например, клетка, экспрессирующая CAR, описанная в данном документе, также может экспрессировать усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), у которого отсутствует способность к передаче сигнала, но сохраняется эпитоп, распознаваемый молекулами, способными индуцировать ADCC, например, цетуксимабом (ERBITUX®), так что введение цетуксимаба индуцирует ADCC и последующее истощение популяции клеток, экспрессирующих CAR (см., например, WO2011/056894 и Jonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860). Другая стратегия предусматривает обеспечение экспрессии высококомпактного маркерного/"суицидального" гена, в котором объединены эпитопы-мишени обоих из антигенов CD32 и CD20 в клетках, экспрессирующих CAR, описанных в данном документе, которые связываются с ритуксимабом, что приводит к избирательному истощению популяции клеток, экспрессирующих CAR, например, посредством ADCC (см., например, Philip et al., Blood.

2014; 124(8)1277-1287). Другие способы истощения популяции клеток, экспрессирующих CAR, описанных в данном документе, включают введение CAMPATH - моноклонального антитела к CD52, которое избирательно связывается со зрелыми лимфоцитами, например, клетками, экспрессирующими CAR, и направляет их на разрушение, например, посредством индукции ADCC. В других вариантах осуществления на клетку, экспрессирующую CAR, можно осуществлять избирательное нацеливание с помощью лиганда CAR, например, антиидиотипического антитела. В некоторых вариантах осуществления антиидиотипическое антитело может обуславливать активность эффекторных клеток, например, формы активности ADCC или ADC, за счет чего обеспечивается снижение количества клеток, экспрессирующих CAR. В других вариантах осуществления лиганд CAR, например, антиидиотипическое антитело, может быть связан со средством, которое индуцирует уничтожение клеток, например, токсином, за счет чего обеспечивается снижение количества клеток, экспрессирующих CAR. В качестве альтернативы молекулы CAR сами по себе могут быть представлены в такой конфигурации, при которой активность можно регулировать, например, путем включения или выключения, как описано ниже.

В других вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, описанная в данном документе, также может экспрессировать белок-мишень, распознаваемый средством, обеспечивающим истощение популяции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления белок-мишень представляет собой CD20, и средство, обеспечивающее истощение популяции Т-клеток, представляет собой антитело к CD20, например, ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее истощение популяции Т-клеток, вводят тогда, когда необходимо снизить количество клеток, экспрессирующих CAR, или устранить их, например, чтобы уменьшить токсичность, индуцированную CAR. В других вариантах осуществления средство, обеспечивающее истощение популяции Т-клеток, представляет собой антитело к CD52, например, алемтузумаб, описанное в примерах в данном документе.

В других вариантах осуществления RCAR содержит набор полипептидов, как правило, в простейших вариантах осуществления два, в которых составляющие стандартного CAR, описанного в данном документе, например, антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен, разделены на отдельные полипептиды или компоненты. В некоторых вариантах осуществления набор полипептидов содержит димеризационный переключатель, который при наличии димеризующей молекулы может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых вариантах осуществления в CAR по настоящему изобретению используется такой димеризационный переключатель, как описанные, например, в WO2014127261, включенной в данный документ посредством ссылки. Дополнительное описание и иллюстративные конфигурации таких регулируемых CAR представлены в данном документе и, например, в абзацах 527-551 международной публикации № WO 2015/090229, поданной 13 марта 2015 года, которая включена

посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления RCAR предусматривает наличие переключающего домена, например, переключающего домена FKBP, указанного под SEQ ID NO: 275, или содержит фрагмент FKBP, обладающий способностью связываться с FRB, например, указанный под SEQ ID NO: 276. В некоторых вариантах осуществления RCAR предусматривает наличие переключающего домена, содержащего последовательность FRB, например, указанную под SEQ ID NO: 277, или мутантную последовательность FRB, например, указанную под любым из SEQ ID NO: 278-283.

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLED GKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKLETSY (SEQ ID NO: 275)

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQE VIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETS (SEQ ID NO: 276)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQA YGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISK (SEQ ID NO: 277)

Таблица 18. Иллюстративный мутантный FRB, характеризующийся повышенной аффинностью в отношении димеризующей молекулы

Мутантный FRB	**Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO:**
Мутантная форма E2032I	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAM MERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGN VKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	278
Мутантная форма E2032L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAM MERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGN VKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	279
Мутантная форма T2098L	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAM MERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGN VKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	280
Мутантная форма E2032, T2098	ILWHEMWHEGL**X**EASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAM MERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGN VKDL**X**QAWDLYYHVFRRISKTS	281
Мутантная форма E2032I, T2098L	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAM MERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGN VKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	282
Мутантная форма	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAM MERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGN	283

E2032L, T2098L	VKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	

Трансфекция РНК

В данном документе раскрыты способы получения РНК, транскрибированной in vitro, кодирующей CAR. РНК, кодирующая CAR, и способы ее применения описаны, например, в абзацах 553-570 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Иммунная эффекторная клетка может содержать CAR, кодируемый матричной РНК (мРНК). В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующую CAR, описанную в данном документе, вводят в иммунную эффекторную клетку, например, полученную посредством способа, описанного в данном документе, для получения клетки, экспрессирующей CAR.

В некоторых вариантах осуществления РНК, транскрибированную in vitro, кодирующую CAR, можно вводить в клетку в форме транзиентной трансфекции. РНК получают путем транскрипции in vitro с использованием матрицы, полученной посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК, представляющая интерес, из любого источника может быть непосредственно преобразована с помощью ПЦР в матрицу для синтеза мРНК in vitro с использованием соответствующих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может быть, например, геномная ДНК, плазмидная ДНК, фаговая ДНК, кДНК, синтетическая последовательность ДНК или любой другой подходящий источник ДНК. Требуемая матрица для транскрипции in vitro представляет собой CAR, описанный в данном документе. Например, матрица для РНК, кодирующей CAR, содержит внеклеточную область, содержащую одноцепочечный вариабельный домен антитела к опухолеассоциированному антигену, описанный в данном документе; шарнирную область (например, шарнирную область, описанную в данном документе), трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, описанный в данном документе, такой как трансмембранный домен CD8a) и цитоплазматическую область, которая содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе, например, содержащий сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, подлежащая применению в ПЦР, содержит открытую рамку считывания. ДНК может быть получена из встречающейся в природе последовательности ДНК из генома организма. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать некоторые или все из 5'- и/или 3'-нетранслируемых областей (UTR). Нуклеиновая кислота может содержать экзоны и интроны. В некоторых вариантах осуществления ДНК, подлежащая применению в ПЦР, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты человека. В некоторых вариантах осуществления ДНК, подлежащая применению в ПЦР, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты человека, содержащую 5'- и 3'-UTR. В качестве альтернативы ДНК может представлять собой искусственную последовательность ДНК,

которая обычно не экспрессируется у встречающегося в природе организма. Иллюстративная искусственная последовательность ДНК представляет собой последовательность, которая содержит части генов, лигированные друг с другом с образованием открытой рамки считывания, которая кодирует слитый белок. Части ДНК, лигированные друг с другом, могут быть получены из одного организма или из более чем одного организма.

ПЦР применяют для получения матрицы, предназначенной для транскрипции in vitro мРНК, которая применяется для трансфекции. Способы осуществления ПЦР хорошо известны из уровня техники. Праймеры для применения в ПЦР разрабатывают таким образом, чтобы они имели области, по существу комплементарные областям ДНК, подлежащей применению в качестве матрицы для ПЦР. Используемый в данном документе термин "по существу комплементарные" относится к последовательностям нуклеотидов, где большинство или все основания в последовательности праймера являются комплементарными, или одно или несколько оснований являются некомплементарными или несовпадающими. По существу комплементарные последовательности способны отжигаться или гибридизироваться с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях отжига, используемых для ПЦР. Праймеры можно разрабатывать таким образом, чтобы они были по существу комплементарными любой части ДНК-матрицы. Например, праймеры можно разрабатывать таким образом, чтобы обеспечить амплификацию части нуклеиновой кислоты, которая обычно транскрибируется в клетках (открытой рамки считывания), включающей 5'- и 3'-UTR. Праймеры также можно разрабатывать таким образом, чтобы обеспечить амплификацию части нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный домен, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления праймеры разработаны таким образом, что они обеспечивают амплификацию кодирующей области кДНК человека, в том числе 5'- и 3'-UTR целиком или их частей. Праймеры, применимые для ПЦР, могут быть получены посредством способов синтеза, которые хорошо известны из уровня техники. "Прямые праймеры" представляют собой праймеры, которые содержат область из нуклеотидов, по существу комплементарных нуклеотидам в ДНК-матрице, которые расположены выше последовательности ДНК, подлежащей амплификации. "Вышерасположенное" используется в данном документе для обозначения местоположения в 5'-направлении от последовательности ДНК, подлежащей амплификации, относительно кодирующей цепи. "Обратные праймеры" представляют собой праймеры, которые содержат области из нуклеотидов, по существу комплементарных нуклеотидам в двухнитевой ДНК-матрице, которые расположены ниже последовательности ДНК, подлежащей амплификации. "Нижерасположенное" используется в данном документе для обозначения местоположения в 3'-направлении от последовательности ДНК, подлежащей амплификации, относительно кодирующей нити.

В способах, раскрытых в данном документе, может применяться любая ДНК-полимераза, применимая для ПЦР. Реагенты и полимераза являются коммерчески

доступными из ряда источников.

Также можно использовать химические структуры, которые могут способствовать стабильности и/или эффективности трансляции. РНК в ряде вариантов осуществления содержит 5'- и 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления длина 5'-UTR составляет от одного до 3000 нуклеотидов. Длину последовательностей 5'- и 3'-UTR, которые подлежат добавлению к кодирующей области, можно изменять с помощью различных способов, включая без ограничения разработку праймеров для ПЦР, которые отжигаются с различными областями UTR. Используя данный подход, специалист средней квалификации в данной области может модифицировать длину 5'- и 3'-UTR, необходимую для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

5'- и 3'-UTR могут представлять собой встречающиеся в природе эндогенные 5'- и 3'-UTR для нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. В качестве альтернативы последовательности UTR, которые не являются эндогенными для нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, могут быть добавлены путем включения последовательностей UTR в состав прямого и обратного праймеров или с помощью любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей UTR, которые не являются эндогенными для нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, может быть применимым для модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что AU-богатые элементы в последовательностях 3'-UTR могут уменьшать стабильность мРНК. Следовательно, 3'-UTR могут быть выбраны или разработаны таким образом, чтобы они увеличивали стабильность транскрибированной РНК, исходя из свойств UTR, которые хорошо известны из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR может содержать последовательность Козак из эндогенной нуклеиновой кислоты. В качестве альтернативы, если 5'-UTR, которая не является эндогенной для нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, добавляют с помощью ПЦР, как описано выше, консенсусная последовательность Козак может быть видоизменена путем добавления последовательности 5'-UTR. Последовательности Козак могут увеличивать эффективность трансляции некоторых РНК-транскриптов, но, по-видимому, они не являются необходимыми для обеспечения эффективной трансляции всех РНК. Требование наличия последовательностей Козак для многих мРНК известно из уровня техники. В других вариантах осуществления 5'-UTR может представлять собой 5'-UTR из РНК-содержащего вируса, РНК-геном которого является стабильным в клетках. В других вариантах осуществления можно использовать различные аналоги нуклеотидов в 3'- или 5'-UTR, чтобы воспрепятствовать разрушению мРНК под действием экзонуклеаз.

Для обеспечения синтеза РНК с ДНК-матрицы без необходимости клонирования гена промотор транскрипции должен быть присоединен к ДНК-матрице выше последовательности, подлежащей транскрипции. Если последовательность, которая функционирует в качестве промотора для РНК-полимеразы, добавляют к 5'-концу прямого

праймера, то промотор для РНК-полимеразы включается в состав продукта ПЦР выше открытой рамки считывания, которая подлежит транскрипции. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор для полимеразы Т7, как описано в другом разделе в данном документе. Другие применимые промоторы включают без ограничения промоторы для РНК-полимераз Т3 и SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов Т7, Т3 и SP6 известны из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит как кэп на 5'-конце, так и 3'-поли(А)-хвост, которые определяют связывание с рибосомой, инициацию трансляции и стабильность мРНК в клетке. На кольцевой ДНК-матрице, например, плазмидной ДНК, РНК-полимераза продуцирует длинный конкатемерный продукт, который не подходит для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линеаризованной на конце 3'-UTR, приводит к образованию мРНК нормального размера, которая не является эффективной для трансфекции у эукариот даже в случае ее полиаденилирования после транскрипции.

На линейной ДНК-матрице РНК-полимераза фага Т7 может удлинять 3'-конец транскрипта за пределы последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003).

Традиционный способ интеграции отрезков поли(А)/(Т) в ДНК-матрицу представляет собой молекулярное клонирование. Однако последовательность поли(А)/(Т), интегрированная в плазмидную ДНК, может обуславливать нестабильность плазмиды, вследствие чего плазмидные ДНК-матрицы, полученные из бактериальных клеток, зачастую сильно засорены делециями и другими аберрациями. Это приводит к тому, что процедуры клонирования являются не только трудоемкими и времязатратными, но зачастую и ненадежными. Поэтому существует большая потребность в способе, который позволяет конструировать ДНК-матрицы с отрезками поли(А)/(Т) на 3'-конце без клонирования.

Сегмент поли(А)/(Т) в транскрипционной ДНК-матрице можно получить в ходе ПЦР с применением обратного праймера, содержащего поли(Т)-хвост, такой как хвост из 100 Т (SEQ ID NO: 31) (размер может составлять 50-5000 Т (SEQ ID NO: 32)), или после ПЦР с помощью любого другого способа, в том числе без ограничения лигирования или рекомбинации ДНК in vitro. Поли(А)-хвосты также обеспечивают стабильность РНК и уменьшают их разрушение. Как правило, длина поли(А)-хвоста положительно коррелирует со стабильностью транскрибированной РНК. В некоторых вариантах осуществления длина поли(А)-хвоста составляет от 100 до 5000 остатков аденозина (например, SEQ ID NO: 33).

Поли(А)-хвосты РНК могут быть дополнительно удлинены после транскрипции in vitro путем использования поли(А)-полимеразы, такой как поли(А)-полимераза E. coli (E-PAP). В некоторых вариантах осуществления увеличение длины поли(А)-хвоста от 100 нуклеотидов до 300-400 нуклеотидов (SEQ ID NO: 34) дает в результате приблизительно

двукратное увеличение эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение различных химических групп к 3'-концу может увеличивать стабильность мРНК. Такое присоединение может включать присоединение модифицированных/искусственных нуклеотидов, аптамеров и других соединений. Например, в состав поли(А)-хвоста с помощью поли(А)-полимеразы могут быть включены аналоги АТР. Аналоги АТР могут дополнительно увеличивать стабильность РНК.

5'-кэп-структуры также обеспечивают стабильность молекул РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК, полученные посредством способов, раскрытых в данном документе, содержат 5'-кэп. 5'-кэп получают с помощью методик, известных из уровня техники и описанных в данном документе (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

РНК, полученные посредством способов, раскрытых в данном документе, также могут содержать последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES может быть любой вирусной, хромосомной или искусственно разработанной последовательностью, которая инициирует кэп-независимое связывание рибосомы с мРНК и содействует инициации трансляции. Могут быть включены любые растворенные вещества, подходящие для электропорации клеток, которые могут включать факторы, содействующие проникновению в клетку и жизнеспособности клеток, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества.

РНК можно вводить в клетки-мишени с помощью любого из целого ряда различных способов, например, коммерчески доступных способов, которые включают без ограничения электропорацию (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Кельн, Германия)), ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Бостон, Массачусетс) или Gene Pulser II (BioRad, Денвер, Колорадо), Multiporator (Eppendorf, Гамбург, Германия)), трансфекцию, опосредованную катионными липосомами, с применением липофекции, инкапсуляцию в полимеры, трансфекцию, опосредованную пептидами, или биобаллистические системы доставки частиц, такие как "генные пушки" (см., например, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001).

Невирусные способы доставки

В некоторых вариантах осуществления можно применять невирусные способы для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в данном документе, в клетку, или ткань, или организм субъекта.

В некоторых вариантах осуществления невирусный способ включает применение транспозона (также называемого мобильным генетическим элементом). В некоторых вариантах осуществления транспозон представляет собой фрагмент ДНК, который может самостоятельно вставляться в определенное местоположение в геноме, например, фрагмент ДНК, который способен к саморепликации и вставке своей копии в геном, или фрагмент ДНК, который с помощью сплайсинга может быть вырезан из более длинной нуклеиновой кислоты и вставлен в другое место в геноме. Например, транспозон

содержит последовательность ДНК, состоящую из инвертированных повторов, фланкирующих гены для транспозиции.

Иллюстративные способы доставки нуклеиновой кислоты с применением транспозона включают транспозонную систему "спящая красавица" (SBTS) и транспозонную систему piggyBac™ (PB). См., например, Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20.R1(2011):R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang et al. Mol. Ther. 16(2008):580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al. Blood. 122.21(2013):166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65; и Ding et al. Cell. 122.3(2005):473-83, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

SBTS содержит два компонента: 1) транспозон, содержащий трансген, и 2) источник фермента транспозазы. Транспозаза может обеспечивать перенос транспозона из плазмиды-носителя (или другой донорной ДНК) в целевую ДНК, такую как хромосома/геном клетки-хозяина. Например, транспозаза связывается с плазмидой-носителем/донорной ДНК, вырезает транспозон (в том числе трансген(трансгены)) из плазмиды и вставляет его в геном клетки-хозяина. См., например, Aronovich et al. *выше*

Иллюстративные транспозоны включают транспозон на основе pT2. См., например, Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47; и Singh et al. Cancer Res. 68,8(2008): 2961-2971, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. Иллюстративные транспозазы включают транспозазу типа Tc1/mariner, например, транспозазу SB10 или транспозазу SB11 (гиперактивную транспозазу, которая может экспрессироваться, например, под контролем промотора цитомегаловируса). См., например, Aronovich et al.; Kebriaei et al. и Grabundzija et al., все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Применение SBTS обеспечивает эффективную интеграцию и экспрессию трансгена, например, нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в данном документе. В данном документе представлены способы получения клетки, например, Т-клетки или NK-клетки, которая стабильно экспрессирует CAR, описанный в данном документе, например, с применением системы транспозонов, такой как SBTS.

В соответствии со способами, описанными в данном документе, в некоторых вариантах осуществления одна или несколько нуклеиновых кислот, например, плазмид, содержащих компоненты SBTS, доставляются в клетку (например, Т- или NK-клетку). Например, нуклеиновую(нуклеиновые) кислоту(кислоты) доставляют с помощью стандартных способов доставки нуклеиновых кислот (например, плазмидной ДНК), например, с помощью описанных в данном документе способов, например, электропорации, трансфекции или липофекции. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит транспозон, содержащий трансген, например, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит транспозон, содержащий трансген (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, описанный в данном

документе), а также последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент транспозазу. В других вариантах осуществления представлена система с двумя нуклеиновыми кислотами, например, система с двумя плазмидами, например, где первая плазмида содержит транспозон, содержащий трансген, а вторая плазмида содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент транспозазу. Например, первая и вторая нуклеиновые кислоты совместно доставляются в клетку-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т- или NK-клетки, которые экспрессируют CAR, описанный в данном документе, получают с помощью комбинации вставки гена с помощью SBTS и генетического редактирования с помощью нуклеазы (например, нуклеаз с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), системы CRISPR/Cas или сконструированных мегануклеаз, представляющих собой реконструированные хоминг-эндонуклеазы).

В некоторых вариантах осуществления применение невирусного способа доставки делает возможным перепрограммирование клеток, например, Т- или NK-клеток, и прямую инфузию клеток в организм субъекта. Преимущества невирусных векторов включают без ограничения простоту и относительно низкую стоимость получения достаточных количеств, необходимых для удовлетворения требованиям популяции пациентов, стабильность при хранении и отсутствие иммуногенности.

Способы изготовления/получения

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно включают введение средства, обеспечивающего истощение популяции Т-клеток, после лечения с помощью клетки (например, иммунной эффекторной клетки, описанной в данном документе), за счет чего обеспечивается снижение количества (например, истощение популяции) клеток, экспрессирующих CAR (например, клеток, экспрессирующих CAR для CD19). Такие средства, обеспечивающие истощение популяции Т-клеток, можно применять для эффективного истощения популяции клеток, экспрессирующих CAR (например, клеток, экспрессирующих CAR для CD19), для уменьшения токсичности. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, были изготовлены в соответствии со способом, описанным в данном документе, например, подвергнуты анализу (например, до или после трансфекции или трансдукции) в соответствии со способом, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее истощение популяции Т-клеток, вводят через одну, две, три, четыре или пять недель после введения клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, описанной в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее истощение популяции Т-клеток, представляет собой средство, которое обеспечивает истощение популяции Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, посредством индукции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности(ADCC) и/или комплемент-

индуцированной гибели клеток. Например, клетки, экспрессирующие CAR, описанные в данном документе, могут также экспрессировать антиген (например, антиген-мишень), который распознается молекулами, способными индуцировать гибель клеток, например, ADCC или комплемент-индуцированную гибель клеток. Например, клетки, экспрессирующие CAR, описанные в данном документе, также могут экспрессировать белок-мишень (например, рецептор), на который могут нацеливаться антитело или фрагмент антитела. Примеры таких белков-мишеней включают без ограничения EpCAM, VEGFR, интегрины (например, интегрины αvβ3, α4, αI3/4β3, α4β7, α5β1, αvβ3, αv), представителей суперсемейства рецепторов TNF (например, TRAIL-R1, TRAIL-R2), рецептор PDGF, рецептор интерферона, рецептор фолиевой кислоты, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, рецептор IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/рецептор IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/базиджин, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 и EGFR и их усеченные варианты (например, варианты, в которых сохраняются один или несколько внеклеточных эпитопов, но отсутствуют одна или нескольких областей в цитоплазматическом домене).

В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, совместно экспрессирует CAR и белок-мишень, например, естественным образом экспрессирует белок-мишень или сконструирована таким образом, что она экспрессирует белок-мишень. Например, клетка, например, популяция иммунных эффекторных клеток, может содержать нуклеиновую кислоту (например, вектор), содержащую нуклеиновую кислоту CAR (например, нуклеиновую кислоту CAR, описанную в данном документе) и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-мишень.

В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее истощение популяции Т-клеток, представляет собой ингибитор CD52, например, молекулу антитела к CD52, например, алемтузумаб.

В других вариантах осуществления клетка, например, популяция иммунных эффекторных клеток, экспрессирует молекулу CAR, описанную в данном документе (например, CAR для CD19), и белок-мишень, распознаваемый средством, обеспечивающим истощение популяции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления белок-мишень представляет собой CD20. В ряде вариантов осуществления, в которых белок-мишень представляет собой CD20, средство, обеспечивающее истощение популяции Т-клеток, представляет собой антитело к CD20, например, ритуксимаб.

В дополнительных вариантах осуществления любого из вышеупомянутых способов способы дополнительно включают трансплантацию клетки, например, гемопоэтической стволовой клетки, или костного мозга в организм млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описан способ подготовки млекопитающего перед трансплантацией клеток. Способ включает введение млекопитающему эффективного количества клетки, содержащей нуклеиновую кислоту

или полипептид CAR, например, нуклеиновую кислоту или полипептид CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления трансплантация клеток представляет собой трансплантацию стволовых клеток, например, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, или трансплантацию костного мозга. В других вариантах осуществления подготовка субъекта перед трансплантацией клеток включает снижение у субъекта количества клеток, экспрессирующих мишень, например, нормальных клеток, экспрессирующих CD19, или раковых клеток, экспрессирующих CD19.

Элютриация

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают способ элютриации, посредством которого удаляют нежелательные клетки, например, моноциты и бластные клетки, что в результате приводит к улучшенному обогащению требуемыми иммунными эффекторными клетками, подходящими для экспрессии CAR. В одном варианте осуществления способ элютриации, описанный в данном документе, оптимизирован для обогащения требуемыми иммунными эффекторными клетками, подходящими для экспрессии CAR, из ранее замороженного образца, например, размороженного образца. В некоторых вариантах осуществления способ элютриации, описанный в данном документе, обеспечивает получение клеток с улучшенной чистотой по сравнению с получением клеток, собранных согласно протоколам элютриации, известным из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления способ элютриации, описанный в данном документе, включает использование оптимизированной вязкости исходного образца, например, образца клеток, например, размороженного образца клеток, путем разбавления определенными изотоническими растворами (например, PBS), а также использование оптимизированной комбинации скоростей потока и объема собираемого материала для каждой фракции, собираемой с помощью устройства для элютриации. Иллюстративные способы элютриации, которые можно применять в настоящем изобретении, описаны на страницах 48-51 из WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Центрифугирование в градиенте плотности

Изготовление продукта для адоптивной клеточной терапии требует обработки требуемых клеток, например, иммунных эффекторных клеток, для отделения от сложной смеси клеток крови и элементов крови, присутствующих в исходных материалах периферической крови, полученных путем афереза. Образцы лимфоцитов периферической крови были успешно выделены с помощью центрифугирования в градиенте плотности в растворе Ficoll. Однако Ficoll не является предпочтительным реагентом для выделения клеток для терапевтического применения, поскольку Ficoll не пригоден для клинического применения. Кроме того, Ficoll содержит гликоль, который потенциально токсичен для клеток. Кроме того, при центрифугировании в градиенте плотности Ficoll размороженных продуктов афереза после криоконсервации получают неоптимальный продукт на основе Т-клеток, например, как описано в примерах в данном

документе. Например, в препаратах клеток, выделенных посредством центрифугирования в градиенте плотности в растворе Ficoll, наблюдали утрату Т-клеток в конечном продукте с относительным увеличением количества клеток, отличных от Т-клеток, особенно нежелательных В-клеток, бластных клеток и моноцитов.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, обезвоживаются во время криоконсервации, становясь более плотными, чем свежие клетки. Не ограничиваясь какой-либо теорией, также полагают, что иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, остаются более плотными дольше, чем другие клетки крови, и, таким образом, легче утрачиваются при разделении в градиенте плотности Ficoll по сравнению с другими клетками. Соответственно, не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что среда с плотностью, превышающей плотность Ficoll, будет обеспечивать улучшенное выделение требуемых иммунных эффекторных клеток по сравнению с Ficoll или другими средами с такой же плотностью, как у Ficoll, например, 1,077 г/мл.

В некоторых вариантах осуществления способ центрифугирования в градиенте плотности, описанный в данном документе, включает применение среды с градиентом плотности, содержащей йодиксанол. В некоторых вариантах осуществления среда с градиентом плотности содержит приблизительно 60% йодиксанола в воде.

В некоторых вариантах осуществления способ центрифугирования в градиенте плотности, описанный в данном документе, включает применение среды с градиентом плотности, характеризующейся плотностью, превышающей плотность Ficoll. В некоторых вариантах осуществления способ центрифугирования в градиенте плотности, описанный в данном документе, включает применение среды с градиентом плотности, характеризующейся плотностью более 1,077 г/мл, например, более 1,077 г/мл, более 1,1 г/мл, более 1,15 г/мл, более 1,2 г/мл, более 1,25 г/мл, более 1,3 г/мл, более 1,31 г/мл. В некоторых вариантах осуществления среда с градиентом плотности характеризуется плотностью, составляющей приблизительно 1,32 г/мл.

Дополнительные варианты осуществления центрифугирования в градиенте плотности описаны на страницах 51-53 в WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Обогащение посредством отбора

В данном документе предусмотрены способы отбора конкретных клеток для обеспечения улучшения обогащения требуемыми иммунными эффекторными клетками, подходящими для экспрессии CAR. В некоторых вариантах осуществления отбор включает положительный отбор, например, отбор по требуемым иммунным эффекторным клеткам. В некоторых вариантах осуществления отбор включает отрицательный отбор, например, отбор по нежелательным клеткам, например, удаление нежелательных клеток. В ряде вариантов осуществления способы положительного или отрицательного отбора, описанные в данном документе, проводят в условиях потока, например, с помощью проточного устройства, например, проточного устройства, описанного в данном

документе. Иллюстративные способы положительного и отрицательного отбора описаны на страницах 53-57 в WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Способы отбора можно проводить в условиях потока, например, с помощью проточного устройства, также называемого системой для обработки клеток, для дополнительного обогащения препарата клеток требуемыми иммунными эффекторными клетками, например, Т-клетками, подходящими для экспрессии CAR. Иллюстративные проточные устройства описаны на страницах 57-70 в WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные способы разделения клеток и удаления гранул описаны на страницах 70-78 в WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Процедуры отбора не ограничиваются теми, которые описаны на страницах 57-70 в WO 2017/117112. Можно применять отрицательный отбор Т-клеток путем удаления нежелательных клеток с помощью гранул с антителами к CD19, CD14 и CD26 от Miltenyi в комбинации с колоночной технологией (CliniMACS® Plus или CliniMACS® Prodigy®) или положительный отбор Т-клеток с помощью комбинации гранул с антителами к CD4 и CD8 от Miltenyi и колоночной технологии (CliniMACS® Plus или CliniMACS® Prodigy®). В качестве альтернативы можно применять бесколоночную технологию с гранулами с высвобождаемыми антителами к CD3 (GE Healthcare).

Кроме того, можно также применять технологии без использования гранул, такие как устройства ThermoGenesis серии X.

Пути клинического применения

Все способы в данном документе можно осуществлять согласно клиническим стандартам надлежащей производственной практики (cGMP).

Способы можно применять для очистки, обогащения, сбора, промывания, концентрирования клеток или для замены сред для клеток, в частности в ходе сбора необработанных исходных материалов (в частности клеток) в начале способа изготовления, а также в ходе способа изготовления для отбора или размножения клеток для клеточной терапии.

Клетки могут включать любое множество клеток. Клетки могут относиться к одному и тому же типу клеток или представлять собой смесь типов клеток. Кроме того, клетки могут быть получены от одного донора, такого как аутологичный донор или один аллогенный донор, для клеточной терапии. Клетки можно получать от пациентов с помощью, например, лейкафереза или афереза. Клетки могут включать Т-клетки, например, могут включать популяцию, которая содержит более 50% Т-клеток, более 60% Т-клеток, более 70% Т-клеток, более 80% Т-клеток или 90% Т-клеток.

Способы отбора могут быть особенно применимыми для отбора клеток перед культивированием и размножением. Например, можно применять парамагнитные частицы, покрытые антителами к CD3 и/или к CD28, для отбора Т-клеток для размножения или для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный

рецептор (CAR) или другой белок. Такой способ применяют для получения Т-клеток CTL019 для лечения острого лимфобластного лейкоза (ALL).

Способы и модули для удаления гранул, раскрытые в данном документе, могут быть особенно применимыми при изготовлении клеток для клеточной терапии, например, при очистке клеток до или после культивирования и размножения. Например, парамагнитные частицы, покрытые антителами к CD3 и/или к CD28, можно применять для селективного размножения Т-клеток, например, тех Т-клеток, которые являются или будут модифицированными посредством введения нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR) или другой белок, таким образом, чтобы CAR экспрессировался Т-клетками. В ходе изготовления таких Т-клеток способы или модули для удаления гранул можно применять для отделения Т-клеток от парамагнитных частиц. Такой способ или модуль для удаления гранул применяют для получения, например, Т-клеток CTL019 для лечения острого лимфобластного лейкоза (ALL).

В одном таком способе, проиллюстрированном в данном документе в качестве примера, клетки, например, Т-клетки, собирают у донора (например, пациента, подлежащего лечению с помощью продукта на основе аутологичных Т-клеток с химерным антигенным рецептором) посредством афереза (например, лейкафереза). Собранные клетки затем можно необязательно очищать, например, с помощью стадии элютриации или с помощью положительного или отрицательного отбора клеток-мишеней (например, Т-клеток). Парамагнитные частицы, например, парамагнитные частицы, покрытые антителами к CD3/CD28, можно затем добавлять к популяции клеток для размножения Т-клеток. Способ также может включать стадию трансдукции, где в клетку вводят нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько требуемых белков, например, CAR, например, CAR, который нацеливается на CD19. Нуклеиновая кислота может быть введена в лентивирусный вектор. Клетки, например, клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, затем можно размножать в течение периода нескольких дней, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше дней, например, в присутствии подходящей среды. После размножения можно применять способы/модули для удаления гранул, раскрытые в данном документе, для отделения требуемых Т-клеток от парамагнитных частиц. Способ может включать одну или несколько стадий удаления гранул согласно способам по настоящему изобретению. Клетки, от которых были удалены гранулы, затем можно составлять для введения пациенту. Примеры CAR-Т-клеток и их изготовление дополнительно описаны, например, в WO2012/079000, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Системы и способы по настоящему изобретению можно применять для любых способов разделения клеток/очистки клеток/удаления гранул от клеток, описанных в WO2012/079000 или связанных с ней заявках. Дополнительные способы изготовления CART описаны, например, в WO2016109410 и WO2017117112, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Системы и способы, описанные в данном документе, могут аналогичным образом

обеспечивать благоприятный эффект для других продуктов для клеточной терапии, обеспечивая уменьшение потерь требуемых клеток, уменьшение степени повреждения клеток и более надежное удаление магнитных и любых непарамагнитных частиц от клеток с меньшим воздействием химических средств или его отсутствием по сравнению с традиционными системами и способами.

Хотя только иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения конкретно описаны выше, будет понятно, что возможны модификации и видоизменения таких примеров без отступления от сущности и подразумеваемого объема настоящего изобретения. Например, магнитные модули и системы, содержащие их, можно организовывать и применять в разнообразных конфигурациях в дополнение к тем, что описаны. Кроме этого, также можно использовать немагнитные модули. Кроме того, системы и способы могут включать дополнительные компоненты и стадии, которые не описаны конкретно в данном документе. Например, способы могут включать первичную обработку, где жидкость сначала вносят в компонент для удаления пузырей и уменьшения противодействия движению суспензии клеток или буфера. Кроме того, варианты осуществления могут включать только часть систем, описанных в данном документе, для применения со способами, описанными в данном документе. Например, варианты осуществления могут относиться к одноразовым модулям, рукавам и т. д., применимым внутри неодноразового оборудования с образованием целостной системы, способной отделять клетки или удалять гранулы от клеток с получением продукта на основе клеток.

Дополнительные способы и процессы изготовления, которые можно применять в комбинации с настоящим изобретением, были описаны в уровне техники. Например, на страницах 86-91 в WO 2017/117112 описаны улучшенные стадии промывания и улучшенный способ изготовления.

Источники иммунных эффекторных клеток

В этом разделе представлены дополнительные способы или стадии для получения исходного образца, содержащего требуемые иммунные эффекторные клетки, выделения и обработки требуемых иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, и удаления нежелательных материалов, например, нежелательных клеток. Дополнительные способы или стадии, описанные в этом разделе, можно применять в комбинации с любым из элютриации, центрифугирования в градиенте плотности, отбора в условиях потока или улучшенной стадии промывания, описанных в предыдущих разделах.

Источник клеток, например, Т-клеток или естественных клеток-киллеров (NK), можно получить от субъекта. Примеры субъектов включают людей, обезьян, шимпанзе, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные формы. Т-клетки можно получить из ряда источников, в том числе из мононуклеарных клеток периферической крови, костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из очага инфекции, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, можно получать из единицы крови, собранной

у субъекта, с помощью любого количества методик, известных специалисту в данной области, и любого из способов, раскрытых в данном документе, при любой комбинации их стадий. В некоторых вариантах осуществления клетки из циркулирующей крови организма индивидуума получают путем афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах осуществления клетки, собранные путем афереза, можно промыть, чтобы удалить фракцию плазмы крови и необязательно поместить клетки в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). В некоторых вариантах осуществления в растворе для промывания отсутствует кальций и может отсутствовать магний или могут отсутствовать многие, если не все, двухвалентные катионы. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают с использованием улучшенной стадии промывания, описанной в данном документе.

Начальные стадии активации в отсутствие кальция могут приводить к усиленной активации. Как будет очевидно для специалистов средней квалификации в данной области, стадию промывания можно осуществлять посредством способов, известных специалистам в данной области, как, например, с помощью полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, устройства для обработки клеток Cobe 2991, CytoMate™ от Baxter или Cell Saver 5 от Haemonetics), Cell Saver Elite от Haemonetics (Sepax или Sefia от GE Healthcare) или устройства, в котором используется технология фильтрации на вращающейся мембране (LOVO от Fresenius Kabi), в соответствии с инструкциями производителя. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащий Ca и не содержащий Mg, PlasmaLyte A, PBS-EDTA, дополненный человеческим сывороточным альбумином (HSA), или другой солевой раствор с буфером или без него. В качестве альтернативы нежелательные компоненты из образца, полученного путем афереза, можно удалить, и клетки можно ресуспендировать непосредственно в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления требуемые иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и истощения по моноцитам, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или посредством противоточного элютриационного центрифугирования.

Способы, описанные в данном документе, могут включать, например, отбор конкретной субпопуляции иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которая представляет собой популяцию клеток, истощенную по регуляторным Т-клеткам, например, с истощением по CD25+ клеткам или истощением по $CD25^{высокий}$ клеткам, с помощью, например, методики отрицательного отбора, например, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, истощенная по регуляторным Т-клеткам, содержит менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%

CD25+ клеток или CD25^{высокий} клеток.

В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки или CD25^{высокий} Т-клетки, удаляют из популяции с помощью антитела к CD25 или его фрагмента или CD25-связывающего лиганда, например, IL-2. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD25 или его фрагмент или CD25-связывающий лиганд конъюгированы с субстратом, например, гранулой, или иным образом покрывают субстрат, например, гранулу. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD25 или его фрагмент конъюгированы с субстратом, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки или CD25^{высокий} Т-клетки, удаляют из популяции с помощью реагента для истощения по CD25 от Miltenyi^{TM}. В некоторых вариантах осуществления соотношение клеток и реагента для истощения по CD25 составляет 1e7 клеток на 20 мкл, или 1e7 клеток на 15 мкл, или 1e7 клеток на 10 мкл, или 1e7 клеток на 5 мкл, или 1e7 клеток на 2,5 мкл, или 1e7 клеток на 1,25 мкл. В некоторых вариантах осуществления, например, для регуляторных Т-клеток используют более 500 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления используют концентрацию клеток, составляющую 600, 700, 800 или 900 миллионов клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащая истощению, содержит приблизительно 6×10^9 CD25+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащая истощению, содержит от приблизительно 1×10^9 до 1×10^{10} CD25+ Т-клеток, включая любое целочисленное значение в этом промежутке. В некоторых вариантах осуществления полученная в результате популяция, истощенная по регуляторным Т-клеткам, содержит 2×10^9 регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток или CD25^{высокий} клеток, или меньше (например, 1×10^9, 5×10^8, 1×10^8, 5×10^7, 1×10^7 или меньше регуляторных Т-клеток).

В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ клетки или CD25^{высокий} клетки, удаляют из популяции с помощью системы CliniMACS с набором трубок для истощения, таким как, например, трубки 162-01. В некоторых вариантах осуществления система CliniMACS работает с установленными параметрами истощения, например, такими как DEPLETION2.1.

Не ограничиваясь конкретной теорией, полагают, что при уменьшении уровня отрицательных регуляторов иммунных клеток (например, уменьшении количества нежелательных иммунных клеток, например, Treg-клеток) у субъекта до афереза или в ходе изготовления продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, значительно снижается риск рецидива у субъекта. Например, способы истощения по Treg-клеткам известны из уровня техники. Способы уменьшения количества Treg-клеток включают без ограничения применение циклофосфамида, антитела к GITR (антитела к GITR, описанного в данном документе), реагента для истощения по CD25 и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления способы изготовления включают снижение

количества (например, истощение) Treg-клеток до изготовления клетки, экспрессирующей CAR. Например, способы изготовления включают приведение образца, например, образца, полученного путем афереза, в контакт с антителом к GITR и/или антителом к CD25 (или его фрагментом или CD25-связывающим лигандом), например, для истощения по Treg-клеткам до изготовления продукта на основе клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), экспрессирующих CAR.

Не ограничиваясь конкретной теорией, полагают, что при уменьшении уровня отрицательных регуляторов иммунных клеток (например, уменьшении количества нежелательных иммунных клеток, например, Treg-клеток) у субъекта до афереза или в ходе изготовления продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, может снижаться риск рецидива у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект получает предварительное лечение с помощью одного или нескольких средств терапии, которые обеспечивают снижение количества Treg-клеток, перед сбором клеток для изготовления продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, за счет чего обеспечивается снижение риска рецидива у субъекта при лечении с помощью клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления способы уменьшения количества Treg-клеток включают без ограничения введение субъекту одного или нескольких из циклофосфамида, антитела к GITR, реагента для истощения по CD25 или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления способы уменьшения количества Treg-клеток включают без ограничения введение субъекту одного или нескольких из циклофосфамида, антитела к GITR, реагента для истощения по CD25 или их комбинации. Введение одного или нескольких из циклофосфамида, антитела к GITR, реагента для истощения по CD25 или их комбинации может происходить до, во время или после инфузии продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR. Введение одного или нескольких из циклофосфамида, антитела к GITR, реагента для истощения по CD25 или их комбинации может происходить до, во время или после инфузии продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления способы изготовления включают снижение количества (например, истощение) Treg-клеток до изготовления клетки, экспрессирующей CAR. Например, способы изготовления включают приведение образца, например, образца, полученного путем афереза, в контакт с антителом к GITR и/или антителом к CD25 (или его фрагментом или CD25-связывающим лигандом), например, для истощения по Treg-клеткам до изготовления продукта на основе клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления субъект получает предварительное лечение с помощью циклофосфамида перед сбором клеток для изготовления продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, за счет чего обеспечивается снижение риска рецидива у субъекта при лечении с помощью клеток, экспрессирующих CAR (например, лечении с помощью CTL019). В некоторых вариантах осуществления субъект получает предварительное лечение с помощью антитела к GITR перед сбором клеток для

изготовления продукта на основе клеток (например, Т-клеток или NK-клеток), экспрессирующих CAR, за счет чего обеспечивается снижение риска рецидива у субъекта при лечении с помощью клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления способ изготовления клеток, экспрессирующих CAR (например, Т-клеток, NK-клеток), модифицируют для обеспечения истощения по Treg-клеткам перед изготовлением продукта на основе клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), экспрессирующих CAR (например, продукта CTL019). В некоторых вариантах осуществления истощение по CD25 применяют для истощения по Treg-клеткам перед изготовлением продукта на основе клеток (например, Т-клеток или NK-клеток), экспрессирующих CAR (например, продукта CTL019).

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, которая должна быть удалена, не представляет собой ни регуляторные Т-клетки, ни опухолевые клетки, а представляет собой клетки, которые в иных отношениях отрицательно влияют на размножение и/или функцию CAR-Т-клеток, например, клетки, экспрессирующие CD14, CD11b, CD33, CD15 или другие маркеры, экспрессируемые потенциально иммуносупрессорными клетками. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что такие клетки удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками и/или опухолевыми клетками, или после указанного истощения, или в другом порядке.

Способы, описанные в данном документе, могут включать более одной стадии отбора, например, более одной стадии истощения. Обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора можно осуществлять, например, с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для клеток, подвергаемых отрицательному отбору. Один из способов представляет собой сортировку и/или отбор клеток с помощью отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых используется коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, подвергаемых отрицательному отбору. Например, для обогащения CD4+ клетками путем отрицательного отбора коктейль моноклональных антител может содержать антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8.

Способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать удаление из популяции клеток, экспрессирующих опухолевый антиген, например, опухолевый антиген, который не включает CD25, например, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 или CD11b, за счет чего обеспечивается получение популяции, истощенной по регуляторным Т-клеткам, например, истощенной по CD25+ клеткам или истощенной по $CD25^{высокий}$ клеткам и истощенной по клеткам с опухолевым антигеном, которая подходит для экспрессии CAR, например, CAR, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками или $CD25^{высокий}$ клетками. Например, антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к опухолевому антигену или его фрагмент могут быть присоединены к одному и тому же

субстрату, например, грануле, который можно использовать для удаления клеток, или антитело к CD25 или его фрагмент или антитело к опухолевому антигену или его фрагмент могут быть присоединены к отдельным гранулам, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других вариантах осуществления удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток или $CD25^{высокий}$ клеток, и удаление клеток, экспрессирующих опухолевый антиген, является последовательным и может происходить, например, в любом порядке.

Также предусмотрены способы, которые включают удаление из популяции клеток, экспрессирующих ингибитор контрольной точки иммунного ответа, например, ингибитор контрольной точки иммунного ответа, описанный в данном документе, например, одного или нескольких из PD1+ клеток, LAG3+ клеток и TIM3+ клеток, за счет чего обеспечивается получение популяции, истощенной по регуляторным Т-клеткам, например, истощенной по CD25+ клеткам и истощенной по клеткам с ингибитором контрольной точки иммунного ответа, например, истощенной по PD1+, LAG3+ и/или TIM3+ клеткам. Иллюстративные ингибиторы контрольных точек иммунного ответа включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекулу MHC I класса, молекулу MHC II класса, GAL9, аденозин и TGF (например, TGF-бета), например, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие ингибитор контрольной точки иммунного ответа, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками или $CD25^{высокий}$ клетками. Например, антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к ингибитору контрольной точки иммунного ответа или его фрагмент могут быть присоединены к одной и той же грануле, которую можно использовать для удаления клеток, или антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к ингибитору контрольной точки иммунного ответа или его фрагмент могут быть присоединены к отдельным гранулам, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других вариантах осуществления удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток или $CD25^{высокий}$ клеток, и удаление клеток, экспрессирующих ингибитор контрольной точки иммунного ответа, является последовательным и может происходить, например, в любом порядке.

Способы, описанные в данном документе, могут включать стадию положительного отбора. Например, Т-клетки можно выделять путем инкубирования с гранулами, конъюгированными с антителами к CD3/CD28 (например, 3×28), такими как Dynabeads® M-450 CD3/CD28 T, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора требуемых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет приблизительно 30 минут. В некоторых вариантах осуществления период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или больше и включает все целочисленные значения в этом промежутке. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В некоторых вариантах

осуществления период времени составляет от 10 до 24 часов, например, 24 часа. Более длительное время инкубирования можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, при которой Т-клеток немного по сравнению с другими типами клеток, как, например, при выделении лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), из опухолевой ткани или у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, при использовании более длительного времени инкубирования может увеличиваться эффективность захвата CD8+ Т-клеток. Таким образом, просто сокращая или удлиняя время, в течение которого Т-клетки имеют возможность связываться с гранулами с антителами к CD3/CD28, и/или увеличивая или уменьшая соотношение гранул и Т-клеток (как дополнительно описано в данном документе), можно предпочтительно осуществлять положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие моменты времени в ходе процесса. Кроме того, путем увеличения или уменьшения соотношения антител к CD3 и/или антител к CD28 на гранулах или другой поверхности можно предпочтительно осуществлять положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие необходимые моменты времени.

В некоторых вариантах осуществления можно выбрать популяцию Т-клеток, которые экспрессируют один или несколько из IFNγ, TNFα, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима B и перфорина или других соответствующих молекул, например, других цитокинов. Способы скрининга в отношении клеточной экспрессии можно определить, например, посредством способов, описанных в публикации согласно PCT № WO 2013/126712.

Для выделения необходимой популяции клеток путем положительного или отрицательного отбора можно варьировать концентрацию клеток и поверхность (например, частицы, такие как гранулы). В определенных аспектах может быть необходимым значительно уменьшить объем, в котором гранулы и клетки смешиваются друг с другом (например, увеличить концентрацию клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и гранул. Например, в некоторых вариантах осуществления используют концентрацию, составляющую 10 миллиардов клеток/мл, 9 миллиардов/мл, 8 миллиардов/мл, 7 миллиардов/мл, 6 миллиардов/мл или 5 миллиардов/мл. В некоторых вариантах осуществления используют концентрацию, составляющую 1 миллиард клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления используют концентрацию клеток, составляющую от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления можно использовать концентрации, составляющие 125 или 150 миллионов клеток/мл.

Использование высоких концентраций может приводить к увеличению выхода клеток, активации клеток и размножения клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые могут характеризоваться слабой экспрессией антигенов-мишеней, представляющих интерес, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или клетки из образцов, в которых присутствует

много опухолевых клеток (например, лейкозной крови, опухолевой ткани и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и может потребоваться их получение. Например, использование высокой концентрации клеток позволяет проводить более эффективный отбор CD8+ Т-клеток, которые обычно характеризуются более слабой экспрессией CD28.

В некоторых вариантах осуществления может потребоваться использование более низких концентраций клеток. Благодаря значительному разбавлению смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы) взаимодействие между частицами и клетками сводится к минимуму. При этом отбираются клетки, которые экспрессируют необходимые антигены, подлежащие связыванию с частицами, в высоких количествах. Например, CD4+ Т-клетки экспрессируют CD28 на более высоких уровнях и захватываются в слабых концентрациях более эффективно, чем CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления используемая концентрация клеток составляет 5×10^6/мл. В некоторых вариантах осуществления используемая концентрация может составлять от приблизительно 1 x 10^5/мл до 1 x 10^6/мл, включая любое целочисленное значение в этом промежутке.

В некоторых вариантах осуществления клетки можно инкубировать на ротаторе в течение различных промежутков времени с различными скоростями при 2-10°C либо при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления множество иммунных эффекторных клеток в популяции не экспрессируют диацилглицеринкиназу (DGK), например, характеризуются дефицитом DGK. В некоторых вариантах осуществления множество иммунных эффекторных клеток в популяции не экспрессируют Ikaros, например, характеризуются дефицитом Ikaros. В некоторых вариантах осуществления множество иммунных эффекторных клеток в популяции не экспрессируют DGK и Ikaros, например, характеризуются дефицитом как DGK, так и Ikaros.

Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после стадии промывания. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что стадия замораживания и последующего размораживания обеспечивает получение более однородного продукта за счет удаления гранулоцитов и в некоторой степени моноцитов из популяции клеток. После стадии промывания, на которой удаляют плазму крови и тромбоциты, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Хотя многие замораживающие растворы и параметры для замораживания известны из уровня техники и будут применимыми в данном случае, один способ предусматривает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% человеческий сывороточный альбумин, или культуральных сред, содержащих 10% декстран 40 в 5% декстрозе, 20% человеческий сывороточный альбумин и 7,5% DMSO или 31,25% PlasmaLyte-A, 31,25% раствор с 5% декстрозой в 0,45% NaCl, 10% декстран 40 в 5% декстрозе, 20% человеческий сывороточный альбумин и 7,5% DMSO, или других подходящих сред для замораживания клеток, содержащих, например, Hespan и PlasmaLyte A, и затем клетки замораживают до -

80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в паровой фазе в резервуаре для хранения жидкого азота. Можно применять другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания незамедлительно при -20°C или в жидком азоте.

В некоторых вариантах осуществления криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в данном документе, и оставляют на один час при комнатной температуре перед активацией посредством способов по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения также предусмотрен сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в период времени до того, как могут понадобиться размножившиеся клетки, описанные в данном документе. Ввиду этого источник клеток, подлежащих размножению, можно собирать в любой необходимый момент времени, и необходимые клетки, такие как Т-клетки, можно выделять и замораживать для последующего применения в терапии с использованием иммунных эффекторных клеток для любых заболеваний или состояний, при которых будет благоприятной терапия с использованием иммунных эффекторных клеток, таких как описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления образец крови или образец, полученный путем афереза, берут у в целом здорового субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец крови или образец, полученный путем афереза, берут у в целом здорового субъекта, для которого существует риск развития заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, и клетки, представляющие интерес, выделяют и замораживают для последующего применения. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки можно размножать, замораживать и использовать позднее. В некоторых вариантах осуществления образцы собирают у пациента вскоре после диагностирования конкретного заболевания, описанного в данном документе, однако до проведения каких-либо видов лечения. В некоторых вариантах осуществления клетки выделяют из образца крови или продукта афереза у субъекта до осуществления какого-либо количества соответствующих способов лечения, в том числе без ограничения лечения такими средствами, как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапия, лучевая терапия, иммуносупрессивные средства, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммунодеструктивные средства, такие как CAMPATH, антитела к CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетки получают от пациента непосредственно после лечения, при котором у субъекта остаются функциональные Т-клетки. В данном отношении наблюдалось, что после определенных видов лечения рака, в частности видов лечения лекарственными средствами, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты обычно восстанавливаются после лечения, качество полученных Т-клеток может быть оптимальным или улучшенным в отношении их способности размножаться ex vivo. Аналогично, после манипуляций ex vivo с применением способов, описанных в данном

документе, эти клетки могут находиться в состоянии, предпочтительном для улучшенного приживления и размножения in vivo. Таким образом, в контексте настоящего изобретения рассматривается сбор клеток крови, в том числе Т-клеток, дендритных клеток или других клеток гемопоэтической линии дифференцировки, во время этой фазы восстановления. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию с помощью GM-CSF) и режимы кондиционирования для создания у субъекта состояния, благоприятного для репопуляции, рециркуляции, регенерации и/или размножения определенных типов клеток, особенно в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в данном документе, получают от субъекта, который получил низкую дозу, усиливающую иммунный ответ, ингибитора mTOR. В некоторых вариантах осуществления популяцию иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, подлежащих конструированию таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, собирают спустя достаточное количество времени или после достаточного введения низкой дозы, усиливающей иммунный ответ, ингибитора mTOR, так чтобы уровень PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или соотношение PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, и PD1-положительных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, у субъекта или в материале, собранном у субъекта, по меньшей мере транзиентно были повышены.

В других вариантах осуществления популяция иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которые были сконструированы или будут сконструированы таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, может быть обработана ex vivo путем приведения ее в контакт с таким количеством ингибитора mTOR, которое обеспечивает увеличение количества PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или обеспечивает увеличение соотношения PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, и PD1-положительных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток.

Принято считать, что в способах применения можно использовать условия для культуральных сред, включающие человеческую сыворотку крови АВ в концентрации 5% или меньше, например, 2%, и использовать известные условия и составы культуральных сред, например, описанные в Smith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS^{TM} Immune Cell Serum Replacement" Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31.

В некоторых вариантах осуществления в способах применения можно использовать условия среды, включающие по меньшей мере приблизительно 0,1%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 0,5%-5%,

приблизительно 0,5%-4,5%, приблизительно 0,5%-4%, приблизительно 0,5%-3,5%, приблизительно 0,5%-3%, приблизительно 0,5%-2,5%, приблизительно 0,5%-2%, приблизительно 0,5%-1,5%, приблизительно 0,5%-1,0%, приблизительно 1,0%-5%, приблизительно 1,5%-5%, приблизительно 2%-5%, приблизительно 2,5%-5%, приблизительно 3%-5%, приблизительно 3,5%-5%, приблизительно 4%-5% или приблизительно 4,5%-5% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 0,5% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 0,5% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 1% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 1,5% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 2% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 2,5% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 3% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 3,5% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 4% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 4,5% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления среда содержит приблизительно 5% сыворотки. В некоторых вариантах осуществления сыворотка предусматривает человеческую сыворотку, например, человеческую сыворотку AB. В некоторых вариантах осуществления сыворотка представляет собой человеческую сыворотку, которой предоставили возможность естественным образом свернуться после сбора, например, сыворотку после коагуляции (ОТС). В некоторых вариантах осуществления сыворотка представляет собой человеческую сыворотку, полученную из плазмы крови. Сыворотку, полученную из плазмы крови, можно получить путем удаления фибрина из объединенной человеческой плазмы крови, собранной в присутствии антикоагулянта, например, цитрата натрия.

В некоторых вариантах осуществления в способах применения можно использовать условия для культуральных сред, включающие бессывороточную среду. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой OpTmizer™ CTS™ (LifeTech), ImmunoCult™ XF (Stemcell Technologies), CellGro™ (CellGenix), TexMacs™ (Miltenyi), Stemline™ (Sigma), Xvivo15™ (Lonza), PrimeXV® (Irvine Scientific) или StemXVivo® (R&D Systems). Бессывороточную среду можно дополнять имитатором сыворотки, таким как ICSR (заменитель сыворотки для иммунных клеток) от LifeTech. Уровень имитатора сыворотки (например, ICSR) может составлять, например, вплоть до 5%, например, приблизительно 1%, 2%, 3%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления бессывороточную среду можно дополнять сывороткой, например, человеческой сывороткой, например, человеческой сывороткой AB. В некоторых вариантах осуществления сыворотка представляет собой человеческую сыворотку, которой предоставили возможность естественным образом свернуться после сбора, например, сыворотку после коагуляции (ОТС). В некоторых вариантах осуществления сыворотка представляет собой человеческую сыворотку, полученную из

плазмы крови. Сыворотку, полученную из плазмы крови, можно получить путем удаления фибрина из объединенной человеческой плазмы крови, собранной в присутствии антикоагулянта, например, цитрата натрия.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в популяции характеризуются дефицитом диацилглицеринкиназы (DGK). Клетки с дефицитом DGK включают клетки, которые не экспрессируют DGK в виде РНК или белка или характеризуются сниженной или ингибированной активностью DGK. Клетки с дефицитом DGK можно получить с помощью генетических подходов, например, путем введения средств для РНК-интерференции, например, siRNA, shRNA, miRNA, для снижения или предотвращения экспрессии DGK. В качестве альтернативы клетки с дефицитом DGK можно получить путем обработки ингибиторами DGK, описанными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в популяции характеризуются дефицитом Ikaros. Клетки с дефицитом Ikaros включают клетки, которые не экспрессируют Ikaros в виде РНК или белка или характеризуются сниженной или ингибированной активностью Ikaros; клетки с дефицитом Ikaros можно получить с помощью генетических подходов, например, путем введения средств для РНК-интерференции, например, siRNA, shRNA, miRNA, для снижения или предотвращения экспрессии Ikaros. В качестве альтернативы клетки с дефицитом Ikaros можно получить путем обработки ингибиторами Ikaros, например, леналидомидом.

В ряде вариантов осуществления популяция Т-клеток характеризуется дефицитом DGK и дефицитом Ikaros, например, в ней не происходит экспрессия DGK и Ikaros или она характеризуется сниженной или ингибированной активностью DGK и Ikaros. Такие клетки с дефицитом DGK и Ikaros можно получить любым из способов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления NK-клетки получают от субъекта. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой линию NK-клеток, например, линию клеток NK-92 (Conkwest).

Аллогенные клетки, экспрессирующие CAR

В ряде вариантов осуществления, описанных в данном документе, иммунная эффекторная клетка может представлять собой аллогенную иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или NK-клетку. Например, клетка может представлять собой аллогенную Т-клетку, например, аллогенную Т-клетку, в которой отсутствует экспрессия функционального Т-клеточного рецептора (TCR) и/или человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), например, HLA I класса и/или HLA II класса.

Т-клетку, в которой отсутствует функциональный TCR, можно, например, сконструировать таким образом, чтобы она вообще не экспрессировала функциональный TCR на своей поверхности, сконструировать таким образом, чтобы она не экспрессировала одну или несколько субъединиц, которые образуют функциональный TCR (например, сконструировать таким образом, чтобы она не экспрессировала (или демонстрировала сниженную экспрессию) TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма, TCR-

дельта, TCR-эпсилон и/или TCR-дзета), или сконструировать таким образом, чтобы она продуцировала очень небольшое количество функционального TCR на своей поверхности. В качестве альтернативы Т-клетка может экспрессировать существенно нарушенный TCR, например, посредством экспрессии мутантных или усеченных форм одной или нескольких субъединиц TCR. Термин "существенно нарушенный TCR" означает, что этот TCR не будет вызывать нежелательную иммунную реакцию у хозяина.

Т-клетку, описанную в данном документе, можно, например, сконструировать таким образом, чтобы она не экспрессировала функциональный HLA на своей поверхности. Например, Т-клетку, описанную в данном документе, можно сконструировать таким образом, чтобы экспрессия HLA, например, HLA I класса и/или HLA II класса, на поверхности клетки была подавлена. В некоторых вариантах осуществления подавление экспрессии HLA можно осуществлять путем снижения или устранения экспрессии бета-2-микроглобулина (B2M).

В некоторых вариантах осуществления в Т-клетке может отсутствовать функциональный TCR и функциональный HLA, например, HLA I класса и/или HLA II класса.

Модифицированные Т-клетки, в которых отсутствует экспрессия функционального TCR и/или HLA, можно получить любым подходящим способом, в том числе путем нокаута или нокдауна одной или нескольких субъединиц TCR или HLA. Например, можно предусмотреть нокдаун TCR и/или HLA в Т-клетке с помощью siRNA, shRNA, коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), или эндонуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZFN).

В некоторых вариантах осуществления аллогенная клетка может представлять собой клетку, в которой не экспрессируется или экспрессируется на низких уровнях ингибирующая молекула, например, благодаря любому способу, описанному в данном документе. Например, клетка может представлять собой клетку, в которой не экспрессируется или экспрессируется на низких уровнях ингибирующая молекула, например, молекула, которая может уменьшать способность клетки, экспрессирующей CAR, осуществлять иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекулу MHC I класса, молекулу MHC II класса, GAL9, аденозин и TGF (например, TGF-бета). Ингибирование ингибирующей молекулы, например, путем ингибирования на уровне ДНК, РНК или белка, может оптимизировать функциональные характеристики клетки, экспрессирующей CAR. В ряде вариантов осуществления можно применять ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, dsRNA, например, siRNA или shRNA, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR), эффекторную нуклеазу, подобную

активаторам транскрипции (TALEN), или эндонуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), например, описанные в данном документе.

siRNA и shRNA для ингибирования TCR или HLA

В некоторых вариантах осуществления экспрессию TCR и/или экспрессию HLA можно ингибировать с помощью siRNA или shRNA, нацеливающихся на нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR и/или HLA, и/или ингибирующую молекулу, описанную в данном документе (например, PD1, PD-L1, PD- L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекулу MHC I класса, молекулу MHC II класса, GAL9, аденозин и TGF-бета), в клетке, например, Т-клетке.

Системы экспрессии для siRNA и shRNA и иллюстративные shRNA описаны, например, в абзацах 649 и 650 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

CRISPR для ингибирования TCR или HLA

Как используется в данном документе, "CRISPR", или "CRISPR для TCR и/или HLA", или "CRISPR для ингибирования TCR и/или HLA" относится к набору коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, или к системе, содержащей такой набор повторов. Как используется в данном документе, "Cas" относится к CRISPR-ассоциированному белку. Система "CRISPR/Cas" относится к системе, полученной из CRISPR и Cas, которую можно применять для сайленсинга или осуществления мутации гена TCR и/или HLA и/или ингибирующей молекулы, описанной в данном документе (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекулы MHC I класса, молекулы MHC II класса, GAL9, аденозина и TGF-бета), в клетке, например, Т-клетке.

Система CRISPR/Cas и пути ее применения описаны, например, в абзацах 651-658 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

TALEN для ингибирования TCR и/или HLA

"TALEN", или "TALEN для HLA и/или TCR", или "TALEN для ингибирования HLA и/или TCR" относится к эффекторной нуклеазе, подобной активаторам транскрипции, представляющей собой искусственную нуклеазу, которую можно применять для редактирования гена HLA и/или TCR и/или ингибирующей молекулы, описанной в данном документе (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекулы MHC I класса, молекулы MHC II класса, GAL9, аденозина и TGF-бета), в клетке, например, Т-клетке.

TALEN и пути их применения описаны, например, в абзацах 659-665 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

Нуклеаза с "цинковыми пальцами" для ингибирования HLA и/или TCR

"ZFN", или "нуклеаза с "цинковыми пальцами", или "ZFN для HLA и/или TCR", или "ZFN для ингибирования HLA и/или TCR" относится к нуклеазе с "цинковыми пальцами", представляющей собой искусственную нуклеазу, которую можно применять для редактирования гена HLA и/или TCR и/или ингибирующей молекулы, описанной в данном документе (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, молекулы MHC I класса, молекулы MHC II класса, GAL9, аденозина и TGF-бета), в клетке, например, Т-клетке.

ZFN и пути их применения описаны, например, в абзацах 666-671 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

Экспрессия теломеразы

Теломеры играют важнейшую роль в персистенции соматических клеток, и их длину поддерживает теломераза (TERT). Длина теломер в клетках CLL может быть очень короткой (Roth et al., "Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70+/CD38 chronic lymphocytic leukaemia" British Journal of Haematology, 143, 383-386, August 28 2008) и может быть еще короче в изготовленных клетках, экспрессирующих CAR, например, клетках CART19, что ограничивает их потенциал размножения после адоптивного переноса пациенту. Экспрессия теломеразы может "спасти" клетки, экспрессирующие CAR, от репликативного истощения.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что в некоторых вариантах осуществления для терапевтической Т-клетки характерна кратковременная персистенция в организме пациента ввиду укороченных теломер в Т-клетке; соответственно, трансфекция с использованием гена теломеразы может приводить к удлинению теломер в Т-клетке и улучшению персистенции Т-клетки в организме пациента. См. Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, например, Т-клетка, характеризуется эктопической экспрессией субъединицы теломеразы, например, каталитической субъединицы теломеразы, например, TERT, например, hTERT. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения клетки, экспрессирующей CAR, включающий приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например, каталитическую субъединицу теломеразы, например, TERT, например, hTERT. Клетку можно приводить в контакт с нуклеиновой кислотой перед приведением в контакт с конструкцией, кодирующей CAR, одновременно с этим

или после этого.

Экспрессия теломеразы может быть стабильной (например, нуклеиновая кислота может интегрироваться в геном клетки) или транзиентной (например, нуклеиновая кислота не интегрируется, и уровень экспрессии снижается спустя некоторый период времени, например, через несколько дней). Стабильная экспрессия может быть достигнута путем трансфекции или трансдукции клетки с помощью ДНК, кодирующей субъединицу теломеразы и селектируемый маркер, и отбора в отношении стабильных интегрантов. В качестве альтернативы или в комбинации, стабильная экспрессия может быть достигнута посредством сайт-специфической рекомбинации, например, с помощью системы Cre/Lox или FLP/FRT.

Транзиентная экспрессия может предусматривать трансфекцию или трансдукцию с помощью нуклеиновой кислоты, например, ДНК или РНК, такой как мРНК. В некоторых вариантах осуществления транзиентная трансфекция мРНК позволяет избежать генетической нестабильности, иногда связанной со стабильной трансфекцией TERT. Транзиентная экспрессия экзогенной теломеразной активности описана, например, в международной заявке WO2014/130909, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В ряде вариантов осуществления трансфекцию субъединицы теломеразы с использованием мРНК проводят в соответствии с платформой Therapeutics™ на основе матричных РНК, коммерциализированной Moderna Therapeutics. Например, способ может представлять собой способ, описанный в патенте США № 8710200, 8822663, 8680069, 8754062, 8664194 или 8680069.

В некоторых вариантах осуществления hTERT имеет аминокислотную последовательность с ID белка в GenBank AAC51724.1 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell, том 90, выпуск 4, 22 августа 1997 г., страницы 785-795):
MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCV
PWDARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTT
SVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPL
YQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLP
LPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGT
RHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPS
LTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTH
CPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLR
RLVPPGLWGSRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRGCAWLRRSPGVGC
VPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSI
GIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRR
EKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPEL
YFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVST
LTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKS
YVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGDMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFL

RTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEV
QSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGVLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNI
YKILLLQAYRFHACVLQLPFHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKG
AAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAA
NPALPSDFKTILD (SEQ ID NO: 284)

В некоторых вариантах осуществления hTERT имеет последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с последовательностью под SEQ ID NO: 284. В некоторых вариантах осуществления hTPET имеет последовательность под SEQ ID NO: 284. В некоторых вариантах осуществления hTERT содержит делецию (например, размером не более 5, 10, 15, 20 или 30 аминокислот) на N-конце, С-конце или на них обоих. В некоторых вариантах осуществления hTERT содержит трансгенную аминокислотную последовательность (например, размером не более 5, 10, 15, 20 или 30 аминокислот) на N-конце, С-конце или на них обоих.

В некоторых вариантах осуществления hTERT кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под № доступа в GenBank AF018167 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell, том 90, выпуск 4, 22 августа 1997 г., страницы 785-795).

Активация и размножение иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток)

Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, полученные или обогащенные посредством способов, описанных в данном документе, можно активировать и размножать, как правило, посредством способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041 и публикации заявки на патент США № 20060121005.

Как правило, популяцию иммунных эффекторных клеток можно размножать путем приведения их в контакт с поверхностью, к которой присоединены средство, стимулирующее передачу сигнала, ассоциированного с комплексом CD3/TCR, и лиганд, стимулирующий костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в данном документе, как, например, путем приведения в контакт с антителом к CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток применяют лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации CD4+ Т-клеток либо CD8+ Т-клеток можно применять антитело к CD3 и антитело к CD28. Примеры антитела к CD28 включают 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Безансон, Франция), и их можно применять, равно как и другие способы,

общеизвестные из уровня техники (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

В некоторых вариантах осуществления первичный стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для Т-клетки можно обеспечивать с помощью различных протоколов. Например, средства, обеспечивающие каждый сигнал, могут находиться в растворе или быть связаны с поверхностью. В случае, если они связаны с поверхностью, средства могут быть связаны с одной и той же поверхностью (т. е. в "цис"-расположении) или с отдельными поверхностями (т. е. в "транс"-расположении). В качестве альтернативы одно средство может быть связано с поверхностью, а другое средство может находиться в растворе. В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее костимулирующий сигнал, связано с клеточной поверхностью, а средство, обеспечивающее первичный сигнал активации, находится в растворе или связано с поверхностью. В некоторых вариантах осуществления оба средства могут находиться в растворе. В некоторых вариантах осуществления средства могут находиться в растворимой форме, а затем быть сшиты с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая Fc-рецепторы или антитело или другое связывающее средство, которое будет связываться с данными средствами. В этом отношении см., например, публикации заявок на патент США №№ 20040101519 и 20060034810 в том, что касается искусственных антигенпрезентирующих клеток (aAPC), которые предполагаются для применения в активации и размножении Т-клеток в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления два средства иммобилизованы на гранулах: либо на одной и той же грануле, т. е. в "цис"-положении, либо на отдельных гранулах, т. е. в "транс"-положении. В качестве примера, средство, обеспечивающее первичный сигнал активации, представляет собой антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, а средство, обеспечивающее костимулирующий сигнал, представляет собой антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент; и оба средства совместно иммобилизованы на одной и той же грануле в эквивалентных молекулярных количествах. В некоторых вариантах осуществления для размножения CD4+ Т-клеток и роста Т-клеток каждое антитело, связанное с гранулами, применяют в соотношении 1:1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения используют такое соотношение антител к CD3:CD28, связанных с гранулами, при котором наблюдается увеличение интенсивности размножения Т-клеток по сравнению с размножением, наблюдаемым при использовании соотношения 1:1. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение в от приблизительно 1 до приблизительно 3 раз по сравнению с размножением, наблюдаемым при использовании соотношения 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение антител к CD3:CD28, связанных с гранулами, находится в диапазоне от 100:1 до 1:100 и включает все целочисленные значения в этом промежутке. В некоторых вариантах осуществления с частицами связано больше антител к CD28, чем антител к CD3, т. е. соотношение антител к CD3:CD28 составляет меньше единицы. В некоторых вариантах

осуществления соотношение антитела к CD28 и антитела к CD3, связанных с гранулами, составляет более чем 2:1. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, применяют в соотношении 1:100. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, применяют в соотношении 1:75. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, применяют в соотношении 1:50. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, применяют в соотношении 1:30. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, применяют в соотношении 1:10. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, применяют в соотношении 1:3. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, применяют в соотношении 3:1.

Для стимуляции Т-клеток или других клеток-мишеней можно использовать соотношения частиц и клеток, составляющие от 1:500 до 500:1, с включением любых целочисленных значений в этом промежутке. Как будет очевидно для специалистов средней квалификации в данной области, соотношение частиц и клеток может зависеть от размера частиц относительно клетки-мишени. Например, гранулы небольшого размера могут связывать лишь немного клеток, тогда как более крупные гранулы могут связывать много клеток. В некоторых вариантах осуществления соотношение клеток и частиц находится в диапазоне от 1:100 до 100:1 и включает любые целочисленные значения в этом промежутке, и в некоторых вариантах осуществления соотношение составляет от 1:9 до 9:1 и включает любые целочисленные значения в этом промежутке, и его также можно использовать для стимуляции Т-клеток. Соотношение частиц, связанных с антителами к CD3 и антителами к CD28, и Т-клеток, которое приводит к стимуляции Т-клеток, может варьироваться, как отмечено выше, однако определенные подходящие значения включают 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 и 15:1, при этом одно подходящее соотношение составляет по меньшей мере 1:1 для частиц на Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления используют соотношение частиц и клеток, составляющее 1:1 или меньше. В некоторых вариантах осуществления подходящее соотношение частицы:клетки составляет 1:5. В некоторых вариантах осуществления соотношение частиц и клеток можно варьировать в зависимости от дня стимуляции. Например, в некоторых вариантах осуществления соотношение частиц и клеток составляет от 1:1 до 10:1 в первый день, и после этого к клеткам ежедневно или раз в два дня добавляют дополнительные частицы в течение периода вплоть до 10 дней при конечных соотношениях от 1:1 до 1:10 (в расчете на значения числа клеток в день добавления). В некоторых вариантах осуществления соотношение частиц и клеток составляет 1:1 в первый день стимуляции и доводится до 1:5 в третий и пятый дни стимуляции. В некоторых вариантах осуществления частицы добавляют каждый день или раз в два дня до конечного соотношения 1:1 в первый день и 1:5 в третий и пятый дни стимуляции. В некоторых вариантах осуществления соотношение частиц и клеток

составляет 2:1 в первый день стимуляции и доводится до 1:10 в третий и пятый дни стимуляции. В некоторых вариантах осуществления частицы добавляют каждый день или раз в два дня до конечного соотношения 1:1 в первый день и 1:10 в третий и пятый дни стимуляции. Специалисту в данной области будет понятно, что для использования в настоящем изобретении может подходить множество других соотношений. В частности, соотношения будут варьироваться в зависимости от размера частиц, а также от размера и типа клеток. В некоторых вариантах осуществления наиболее типичные соотношения для использования составляют примерно 1:1, 2:1 и 3:1 в первый день.

В некоторых вариантах осуществления клетки, такие как Т-клетки, объединяют с гранулами, покрытыми средством, впоследствии гранулы и клетки разделяют, а затем клетки культивируют. В некоторых вариантах осуществления гранулы, покрытые средством, и клетки не разделяют перед культивированием, а культивируют вместе. В некоторых вариантах осуществления гранулы и клетки вначале концентрируют путем приложения силы, такой как сила магнитного поля, что приводит к увеличению лигирования маркеров клеточной поверхности, за счет чего обеспечивается индукция стимуляции клеток.

В качестве примера, белки клеточной поверхности можно лигировать, обеспечивая возможность контакта парамагнитных гранул, к которым присоединены антитела к CD3 и антитела к CD28 (гранул 3 × 28), и Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки (например, от 10^4 до 10^9 Т-клеток) и гранулы (например, парамагнитные гранулы DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T в соотношении 1:1) объединяют в буфере, например, PBS (без двухвалентных катионов, таких как кальций и магний). Специалистам средней квалификации в данной области также будет очевидно, какую концентрацию клеток можно использовать. Например, клетка-мишень может очень редко встречаться в образце и составлять только 0,01% образца, или весь образец (т. е. 100%) может состоять из клетки-мишени, представляющей интерес. Соответственно, любое количество клеток находится в рамках контекста настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления может потребоваться значительно уменьшить объем, в котором частицы и клетки смешивают друг с другом (т. е. увеличить концентрацию клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и частиц. Например, в некоторых вариантах осуществления используют концентрацию, составляющую приблизительно 10 миллиардов клеток/мл, 9 миллиардов/мл, 8 миллиардов/мл, 7 миллиардов/мл, 6 миллиардов/мл, 5 миллиардов/мл или 2 миллиарда клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления используют более 100 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления используют концентрацию клеток, составляющую 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления используют концентрацию клеток, составляющую от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления можно использовать концентрации, составляющие 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличению выхода клеток, активации клеток и размножения клеток. Кроме

того, использование высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые могут характеризоваться слабой экспрессией антигенов-мишеней, представляющих интерес, такие как CD28-отрицательные Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и в некоторых вариантах осуществления может требоваться их получение. Например, использование высокой концентрации клеток позволяет проводить более эффективный отбор CD8+ Т-клеток, которые обычно характеризуются более слабой экспрессией CD28.

В некоторых вариантах осуществления клетки, трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, например, CAR, описанный в данном документе, например, CAR для CD19, описанный в данном документе, размножают, например, посредством способа, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в культуре в течение периода времени, который составляет от нескольких часов (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 час) до приблизительно 14 дней (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней). В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в течение периода от 4 до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в течение периода, который составляет 8 дней или меньше, например, 7, 6 или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в культуре в течение 5 дней, и полученные клетки являются более активными, чем те же самые клетки, размножаемые в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования. Активность можно определить, например, по различным Т-клеточным функциям, например, пролиферации, уничтожению клеток-мишеней, продуцированию цитокинов, активации, миграции, поверхностной экспрессии CAR, уровню CAR, определенному с помощью количественной ПЦР, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления клетки, например, клетки с CAR для CD19, описанные в данном документе, размножаемые в течение 5 дней, демонстрируют по меньшей мере одно-, двух-, трех- или четырехкратное увеличение интенсивности удвоения клеток при стимуляции антигеном по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки, например, клетки, экспрессирующие CAR для CD19, описанные в данном документе, размножают в культуре в течение 5 дней, и полученные клетки демонстрируют более высокие уровни продуцирования провоспалительных цитокинов, например, уровни IFNγ и/или GM-CSF, по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки, например, клетки с CAR для CD19, описанные в данном документе, размножаемые в течение 5 дней, демонстрируют по меньшей мере одно-, двух-, трех-, четырех-, пяти-, десятикратное или большее повышение уровней продуцирования провоспалительных цитокинов в пг/мл, например, уровней IFNγ и/или GM-CSF, по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования.

Также могут потребоваться несколько циклов стимуляции, вследствие чего время

культивирования Т-клеток может составлять 60 дней или больше. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают подходящие среды (например, минимальную питательную среду, α-MEM, среду RPMI 1640, AIM-V, DMEM, F-12 или X-vivo 15 (Lonza), X-Vivo 20, OpTmizer и IMDM), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, в том числе сыворотку (например, фетальную бычью или человеческую сыворотку), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFNγ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ и TNF-α или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области. Другие добавки для роста клеток включают без ограничения поверхностно-активное вещество, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среды могут включать без ограничения RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, OpTmizer и IMDM с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, бессывороточные либо с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы крови), или определенного набора гормонов и/или количества цитокина(цитокинов), достаточных для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, но не в культуры клеток, которые предназначены для инфузии субъекту. Клетки-мишени содержатся в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при соответствующей температуре (например, 37°C) и атмосфере (например, воздух с 5% CO_2).

В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в подходящей среде (например, среде, описанной в данном документе), содержащей один или несколько интерлейкинов, которые приводят к по меньшей мере 200-кратному (например, к 200-кратному, 250-кратному, 300-кратному, 350-кратному) увеличению количества клеток в течение 14-дневного периода размножения, например, согласно измерению посредством способа, описанного в данном документе, такого как проточная цитометрия. В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в присутствии IL-15 и/или IL-7 (например, IL-15 и IL-7).

В ряде вариантов осуществления способы, описанные в данном документе, например, способы изготовления клеток, экспрессирующих CAR, включают удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ Т-клеток или $CD25^{высокий}$ Т-клеток, из популяции клеток, например, с помощью антитела к CD25 или его фрагмента или CD25-связывающего лиганда IL-2. Способы удаления регуляторных Т-клеток, например, CD25+ Т-клеток или $CD25^{высокий}$ Т-клеток, из популяции клеток описаны в данном документе. В ряде вариантов осуществления способы, например, способы изготовления, дополнительно включают приведение популяции клеток (например, популяции клеток, которая была истощена по регуляторным Т-клеткам, таким как CD25+ Т-клетки или $CD25^{высокий}$ Т-клетки; или популяции клеток, которая ранее была приведена в контакт с антителом к CD25, его фрагментом или CD25-связывающим лигандом) в контакт с IL-15 и/или IL-7. Например, популяцию клеток (например, популяцию, которая ранее была приведена в контакт с антителом к CD25, его фрагментом или CD25-связывающим лигандом)

размножают в присутствии IL-15 и/или IL-7.

В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, приводят в контакт с композицией, содержащей полипептид интерлейкин-15 (IL-15), полипептид альфа-субъединицу рецептора интерлейкина-15 (IL-15Ra) или комбинацию как полипептида IL-15, так и полипептида IL-15Ra, например, hetIL-15, в ходе изготовления клетки, экспрессирующей CAR, например, ex vivo. В ряде вариантов осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, приводят в контакт с композицией, содержащей полипептид IL-15, в ходе изготовления клетки, экспрессирующей CAR, например, ex vivo. В ряде вариантов осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, приводят в контакт с композицией, содержащей комбинацию как полипептида IL-15, так и полипептида IL-15Ra, в ходе изготовления клетки, экспрессирующей CAR, например, ex vivo. В ряде вариантов осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, приводят в контакт с композицией, содержащей hetIL-15, в ходе изготовления клетки, экспрессирующей CAR, например, ex vivo.

В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, приводят в контакт с композицией, содержащей hetIL-15, в ходе размножения ex vivo. В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, приводят в контакт с композицией, содержащей полипептид IL-15, в ходе размножения ex vivo. В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, приводят в контакт с композицией, содержащей как полипептид IL-15, так и полипептид IL-15Ra, в ходе размножения ex vivo. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт приводит к выживанию и пролиферации субпопуляции лимфоцитов, например, CD8+ Т-клеток.

Т-клетки, которые подвергались стимуляции в течение разных периодов времени, могут демонстрировать разные характеристики. Например, в типичных препаратах крови или продуктах афереза мононуклеарных клеток периферической крови популяция Т-клеток-хелперов (TH, CD4+) превосходит по числу популяцию цитотоксических Т-клеток или Т-клеток-супрессоров (TC, CD8+). Размножение Т-клеток ex vivo путем стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к получению популяции Т-клеток, которая до приблизительно дней 8-9 состоит главным образом из TH-клеток, тогда как после приблизительно дней 8-9 популяция Т-клеток содержит все более многочисленную популяцию TC-клеток. Соответственно, в зависимости от цели лечения может быть преимущественной инфузия субъекту популяции Т-клеток, содержащей главным образом TH-клетки. Аналогично, если была выделена антигенспецифическая субпопуляция TC-клеток, то может быть целесообразным размножение этой субпопуляции в большей степени.

Кроме того, в ходе процесса размножения клеток в дополнение к маркерам CD4 и CD8 в значительной степени, но по большей части воспроизводимо, варьируются уровни

других фенотипических маркеров. Таким образом, подобная воспроизводимость дает возможность адаптировать продукт на основе активированных Т-клеток для конкретных целей.

После конструирования CAR, описанного в данном документе, можно применять различные анализы для оценивания активности молекулы, такой как, без ограничения, способность Т-клеток размножаться после стимуляции антигеном, устойчивое размножение Т-клеток при отсутствии повторной стимуляции и формы противораковой активности, в соответствующих моделях in vitro и животных моделях. Анализы для оценивания эффектов CAR по настоящему изобретению описаны более подробно ниже.

Вестерн-блот-анализ экспрессии CAR в первичных Т-клетках можно применять для выявления присутствия мономеров и димеров, например, как описано в абзаце 695 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Размножение CAR^+ Т-клеток in vitro после стимуляции антигеном можно измерить с помощью проточной цитометрии. Например, смесь $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток стимулируют с помощью aAPC с αCD3/αCD28, а затем трансдуцируют с помощью лентивирусных векторов, экспрессирующих GFP под контролем промоторов, подлежащих анализу. Иллюстративные промоторы включают промоторы генов IE CMV, EF-1α, убиквитина C или фосфоглицераткиназы (PGK). Флуоресценцию GFP оценивают с помощью проточной цитометрии в день 6 культивирования в субпопуляциях $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). В качестве альтернативы смесь $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток стимулируют с помощью магнитных гранул, покрытых αCD3/αCD28, в день 0 и трансдуцируют с помощью CAR в день 1 с применением бицистронного лентивирусного вектора, экспрессирующего CAR вместе с eGFP с использованием последовательности 2A для "проскока" рибосомы. Культуры повторно стимулируют клетками K562, положительными$^+$ в отношении антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе (K562, экспрессирующими антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе), клетками K562 дикого типа (K562 дикого типа) либо клетками K562, экспрессирующими hCD32 и 4-1BBL в присутствии антитела к CD3 и антитела к CD28 (K562-BBL-3/28). Экзогенный IL-2 добавляют в культуры раз в два дня при 100 МЕ/мл. GFP^+ Т-клетки подсчитывают с помощью проточной цитометрии с использованием подсчета по гранулам. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

Также можно измерять уровень устойчивости размножения CAR^+ Т-клеток при отсутствии повторной стимуляции. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, измеряют средний объем Т-клеток (фл) в день 8 культивирования с использованием устройства для подсчета частиц Multisizer III или более поздней версии от Coulter, Cellometer Vision от Nexcelom или Scepter от Millipore или других устройств для подсчета клеток после стимуляции с помощью магнитных гранул, покрытых αCD3/αCD28, в день 0 и трансдукции с помощью указанного CAR в

день 1.

Животные модели также можно использовать для измерения активности клеток, экспрессирующих CAR, например, как описано в абзаце 698 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Дозозависимый ответ на лечение с помощью CAR можно оценивать, например, как описано в абзаце 699 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Оценка пролиферации клеток и продуцирования цитокинов была описана ранее, как описано в абзаце 700 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Цитотоксичность можно оценить с помощью стандартного анализа высвобождения 51Cr, например, как описано в абзаце 701 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Также можно использовать альтернативные способы без применения радиоактивных изотопов.

Цитотоксичность можно также оценить посредством измерения изменений электрического импеданса адгезивных клеток, например, с помощью анализатора клеток в реальном времени (RTCA) xCELLigence. В некоторых вариантах осуществления цитотоксичность измеряют в несколько моментов времени.

Для оценки специфической миграции и пролиферации CAR в моделях на животных, несущих опухоль, можно применять технологии визуализации, например, как описано в абзаце 702 международной заявки WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Также можно применять другие анализы, включая анализы, описанные в данном документе в разделе "Примеры", а также анализы, которые известны из уровня техники, для оценивания CAR, описанных в данном документе.

В качестве альтернативы или в комбинации со способами, раскрытыми в данном документе, раскрыты способы и композиции для одного или нескольких из выявления и/или количественного определения клеток, экспрессирующих CAR (например, in vitro или in vivo (например, клинического мониторинга)); размножения и/или активации иммунных клеток и/или CAR-специфического отбора, которые предусматривают применение лиганда CAR. В некоторых вариантах осуществления лиганд CAR представляет собой антитело, которое связывается с молекулой CAR, например, связывается с внеклеточным антигенсвязывающим доменом CAR (например, антитело, которое связывается с антигенсвязывающим доменом, например, антиидиотипическое антитело; или антитело, которое связывается с константной областью внеклеточного связывающего домена). В других вариантах осуществления лиганд CAR представляет собой молекулу антигена CAR (например, молекулу антигена CAR, описанную в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления раскрыт способ выявления и/или количественного определения клеток, экспрессирующих CAR. Например, лиганд CAR можно применять для выявления и/или количественного определения клеток, экспрессирующих CAR, in vitro или in vivo (например, для клинического мониторинга клеток, экспрессирующих CAR, у пациента или введения доз пациенту). Способ включает:

получение лиганда CAR (необязательно меченого лиганда CAR, например, лиганда CAR, который содержит маркер, гранулу, радиоактивную или флуоресцентную метку);

получение клетки, экспрессирующей CAR (например, получение образца, содержащего клетки, экспрессирующие CAR, такого как изготовленный образец или клинический образец);

приведение клетки, экспрессирующей CAR, в контакт с лигандом CAR в условиях, при которых происходит связывание, за счет чего обеспечивается выявление уровня (например, количества) присутствующих клеток, экспрессирующих CAR. Связывание клетки, экспрессирующей CAR, с лигандом CAR можно выявлять с помощью стандартных методик, таких как FACS, ELISA и т. п.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт способ размножения и/или активации клеток (например, иммунных эффекторных клеток). Способ включает:

получение клетки, экспрессирующей CAR (например, первой клетки, экспрессирующей CAR, или клетки, транзиентно экспрессирующей CAR);

приведение указанной клетки, экспрессирующей CAR, в контакт с лигандом CAR (например, лигандом CAR, описанным в данном документе) в условиях, при которых происходит размножение и/или пролиферация иммунных клеток, с получением таким образом популяции активированных и/или размножившихся клеток.

В определенных вариантах осуществления лиганд CAR присутствует на субстрате (например, является иммобилизованным на субстрате, например, не встречающемся в природе субстрате, или присоединенным к нему). В некоторых вариантах осуществления субстрат представляет собой неклеточный субстрат. Неклеточный субстрат может представлять собой твердую подложку, выбранную из, например, планшета (например, титрационного микропланшета), мембраны (например, нитроцеллюлозной мембраны), матрицы, чипа или гранулы. В ряде вариантов осуществления лиганд CAR присутствует в субстрате (например, на поверхности субстрата). Лиганд CAR может быть иммобилизован на субстрате, присоединен к нему или ковалентно или нековалентно ассоциирован (например, сшит) с ним. В некоторых вариантах осуществления лиганд CAR присоединен (например, ковалентно присоединен) к грануле. В вышеуказанных вариантах осуществления популяцию иммунных клеток можно размножать in vitro или ex vivo. Способ может дополнительно включать культивирование популяции иммунных клеток в присутствии лиганда молекулы CAR, например, посредством любого из способов, описанных в данном документе.

В других вариантах осуществления способ размножения и/или активации клеток дополнительно включает добавление второй стимулирующей молекулы, например, CD28. Например, лиганд CAR и вторая стимулирующая молекула могут быть иммобилизованы на субстрате, например, на одной или нескольких гранулах, за счет чего обеспечивается увеличение интенсивности размножения и/или активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ отбора клетки, экспрессирующей CAR, или обогащения такой клеткой. Способ включает приведение клетки, экспрессирующей CAR, в контакт с лигандом CAR, описанным в данном документе; и отбор клетки на основании связывания с лигандом CAR.

В еще нескольких других вариантах осуществления представлен способ истощения популяции, снижения количества и/или уничтожения клеток, экспрессирующих CAR. Способ включает приведение клетки, экспрессирующей CAR, в контакт с лигандом CAR, описанным в данном документе; и нацеливание на клетку на основании связывания с лигандом CAR, за счет чего обеспечивается снижение количества и/или уничтожение клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления лиганд CAR связан с токсичным средством (например, токсином или лекарственным средством, разрушающим клетки). В некоторых вариантах осуществления антиидиотипическое антитело может обуславливать активность эффекторных клеток, например, формы активности ADCC или ADC.

Иллюстративные антитела к CAR, которые можно применять в способах, раскрытых в данном документе, описаны, например, в WO 2014/190273 и в Jena et al.,"Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS March 2013 8:3 e57838, содержание которых включено посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы в данном документе оптимизированы для конкретной субпопуляции Т-клеток, например, как описано в заявке на патент США с регистрационным № PCT/US2015/043219, поданной 31 июля 2015 года, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления оптимизированные субпопуляции Т-клеток проявляют повышенную персистенцию по сравнению с контрольной Т-клеткой, например, Т-клеткой другого типа (например, CD8+ или CD4+), экспрессирующей такую же конструкцию.

В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-клетка содержит CAR, описанный в данном документе, при этом CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, подходящий для CD4+ Т-клетки (например, оптимизированный для, например, приведения к ее повышенной персистенции), например, домен ICOS. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетка содержит CAR, описанный в данном документе, при этом CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, подходящий для CD8+ Т-клетки (например, оптимизированный для, например, приведения к ее повышенной персистенции), например, домен 4-1BB, домен CD28 или другой костимулирующий

домен, отличный от домена ICOS. В некоторых вариантах осуществления CAR, описанный в данном документе, содержит антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе, например, представляет собой CAR, содержащий антигенсвязывающий домен.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе описан способ лечения субъекта, например, субъекта, у которого имеется рак. Способ включает введение указанному субъекту эффективного количества:

1) CD4+ Т-клетки, содержащей CAR (CARCD4+), который содержит:

антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе;

трансмембранный домен и

внутриклеточный сигнальный домен, например, первый костимулирующий домен, например, домен ICOS; и

2) CD8+ Т-клетки, содержащей CAR (CARCD8+), который содержит:

антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе;

трансмембранный домен и

внутриклеточный сигнальный домен, например, второй костимулирующий домен, например, домен 4-1BB, домен CD28 или другой костимулирующий домен, отличный от домена ICOS;

где CARCD4+ и CARCD8+ отличаются друг от друга.

Способ необязательно дополнительно включает введение:

3) второй CD8+ Т-клетки, содержащей CAR (второй CARCD8+), который содержит:

антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе;

трансмембранный домен и

внутриклеточный сигнальный домен, где второй CARCD8+ содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, костимулирующий сигнальный домен, отсутствующий в CARCD8+, и необязательно не содержит сигнального домена ICOS.

Способы доставки с помощью биополимеров

В некоторых вариантах осуществления одну или несколько клеток, экспрессирующих CAR, раскрытых в данном документе, можно вводить или доставлять субъекту посредством биополимерного каркаса, например, биополимерного имплантата. Биополимерные каркасы могут поддерживать или усиливать доставку, размножение и/или распространение клеток, экспрессирующих CAR, описанных в данном документе. Биополимерный каркас содержит биосовместимый (например, который по существу не индуцирует воспалительный или иммунный ответ) и/или биоразлагаемый полимер, который может быть встречающимся в природе или синтетическим. Иллюстративные биополимеры описаны, например, в абзацах 1004-1006 международной заявки

WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Фармацевтические композиции и средства для лечения

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения пациента, включающий введение клеток, экспрессирующих CAR, полученных согласно описанному в данном документе, необязательно в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения пациента, включающий введение реакционной смеси, содержащей клетки, экспрессирующие CAR, описанные в данном документе, необязательно в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ транспортировки или приема реакционной смеси, содержащей клетки, экспрессирующие CAR, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения пациента, включающий прием клетки, экспрессирующей CAR, которая была получена согласно описанному в данном документе, и дополнительно включающий введение клетки, экспрессирующей CAR, пациенту, необязательно в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения пациента, включающий получение клетки, экспрессирующей CAR, описанной в данном документе, и дополнительно включающий введение клетки, экспрессирующей CAR, пациенту, необязательно в комбинации с одним или несколькими другими видами терапии. Другим видом терапии может быть, например, противораковая терапия, такая как химиотерапия.

В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, описанные в данном документе, вводят субъекту в комбинации с молекулой, которая обеспечивает уменьшение популяции Treg-клеток. Способы, которые обеспечивают уменьшение количества (например, приводят к истощению) Treg-клеток, известны из уровня техники и включают, например, истощение по CD25, введение циклофосфамида, модулирование функции GITR. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что снижение количества Treg-клеток у субъекта до афереза или до введения клетки, экспрессирующей CAR, описанной в данном документе, приводит к снижению количества нежелательных иммунных клеток (например, Treg) в микроокружении опухоли и снижению риска рецидива у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления средство терапии, описанное в данном документе, например, клетку, экспрессирующую CAR, вводят субъекту в комбинации с молекулой, которая нацеливается на GITR и/или модулирует функции GITR, такой как антагонист GITR и/или антитело к GITR, которые обеспечивают истощение по регуляторным Т-клеткам (Treg). В ряде вариантов осуществления клетки, экспрессирующие CAR, описанные в данном документе, вводят субъекту в комбинации с циклофосфамидом. В некоторых вариантах осуществления молекулы, связывающие

GITR, и/или молекулы, модулирующие функции GITR (например, агонист GITR и/или антитела к GITR, обеспечивающие истощение по Treg), вводят до введения клетки, экспрессирующей CAR. Например, в некоторых вариантах осуществления агонист GITR можно вводить до афереза клеток. В ряде вариантов осуществления циклофосфамид вводят субъекту до введения (например, до инфузии или повторной инфузии) клетки, экспрессирующей CAR, или до афереза клеток. В ряде вариантов осуществления циклофосфамид и антитело к GITR вводят субъекту до введения (например, инфузии или повторной инфузии) клетки, экспрессирующей CAR, или до афереза клеток. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак (например, солидный рак или гематологический рак, такой как ALL или CLL). В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется CLL. В ряде вариантов осуществления у субъекта имеется ALL. В ряде вариантов осуществления у субъекта имеется солидный рак, например, солидный рак, описанный в данном документе. Иллюстративные агонисты GITR включают, например, слитые белки на основе GITR и антитела к GITR (например, бивалентные антитела к GITR), такие как, например, слитый белок на основе GITR, описанный в патенте США № 6111090, европейском патенте № 090505B1, патенте США № 8586023, публикациях согласно PCT №№ WO 2010/003118 и 2011/090754, или антитело к GITR, описанное, например, в патенте США № 7025962, европейском патенте № 1947183B1, патенте США № 7812135, патенте США № 8388967, патенте США № 8591886, европейском патенте № EP 1866339, публикации согласно PCT № WO 2011/028683, публикации согласно PCT № WO 2013/039954, публикации согласно PCT № WO2005/007190, публикации согласно PCT № WO 2007/133822, публикации согласно PCT № WO2005/055808, публикации согласно PCT № WO 99/40196, публикации согласно PCT № WO 2001/03720, публикации согласно PCT № WO99/20758, публикации согласно PCT № WO2006/083289, публикации согласно PCT № WO 2005/115451, патенте США № 7618632 и публикации согласно PCT № WO 2011/051726.

В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, вводят субъекту в комбинации с агонистом GITR, например, агонистом GITR, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления агонист GITR вводят до введения клетки, экспрессирующей CAR. Например, в некоторых вариантах осуществления агонист GITR можно вводить до афереза клеток. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется CLL.

Способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать составление клетки, экспрессирующей CAR, в виде фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции могут содержать клетку, экспрессирующую CAR, например, множество клеток, экспрессирующих CAR, описанных в данном документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или наполнителями. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны,

маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатообразующие средства, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции можно составлять, например, для внутривенного введения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит загрязнителя, например, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, репликационно-компетентного лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, gag HIV, остаточных количеств гранул, покрытых антителами к CD3/CD28, антител мыши, объединенной человеческой сыворотки, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральных сред, клеточных или плазмидных компонентов для упаковки векторов, бактерии и гриба, например, в ней отсутствуют его поддающиеся выявлению уровни. В некоторых вариантах осуществления бактерия представляет собой по меньшей мере бактерию, выбранную из группы, состоящей из Alcaligenes faecalis, Candida albicans, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae и Streptococcus pyogenes группы A.

В случае, если указано "иммунологически эффективное количество", "эффективное противораковое количество", "количество, эффективное для ингибирования рака" или "терапевтическое количество", точное количество композиций, подлежащих введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, размере опухоли, степени инфицирования или метастазирования и состояния пациента (субъекта). В целом, можно отметить, что фармацевтическую композицию, содержащую иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки), описанные в данном документе, можно вводить в дозе от 10^4 до 10^9 клеток/кг массы тела, в некоторых случаях от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целочисленные значения в пределах этих диапазонов. Композиции на основе Т-клеток можно также вводить несколько раз в этих дозах. Клетки можно вводить с помощью методик инфузии, которые являются общеизвестными в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR для CD19) составляет приблизительно 1×10^6, $1{,}1\times10^6$, 2×10^6, $3{,}6\times10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1{,}8\times10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8 или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR для CD19) составляет по меньшей мере приблизительно 1×10^6, $1{,}1\times10^6$, 2×10^6, $3{,}6\times10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1{,}8\times10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8 или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR для CD19) составляет вплоть до приблизительно 1×10^6, $1{,}1\times10^6$, 2×10^6, $3{,}6\times10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1{,}8\times10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8 или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR для CD19) составляет приблизительно $1{,}1\times10^6$-$1{,}8\times10^7$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR для CD19)

составляет приблизительно 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9 или 5×10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR для CD19) составляет по меньшей мере приблизительно 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9 или 5×10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления доза клеток с CAR (например, клеток с CAR для CD19) составляет вплоть до приблизительно 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9 или 5×10^9 клеток.

В некоторых вариантах осуществления субъекту может потребоваться введение активированных иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), и тогда последовательно повторно берут кровь (или осуществляют аферез), активируют иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) из нее и проводят повторную инфузию этих активированных и размножившихся иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) пациенту. Этот процесс можно осуществлять несколько раз каждые несколько недель. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) можно активировать из отобранных образцов крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) активируют из отобранных образцов крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см или 100 куб. см.

Введение рассматриваемых композиций можно осуществлять любым удобным способом. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутрикожно, интратуморально, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, с помощью внутривенной (i.v.) инъекции или внутрибрюшинно, например, с помощью внутрикожной или подкожной инъекции. Композиции на основе иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) можно инъецировать непосредственно в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

Режим введения доз

В некоторых вариантах осуществления доза жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR (например, жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR для CD19, BCMA, CD20 или CD22), составляет от приблизительно $0,5\times10^6$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, до приблизительно $1,25\times10^9$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR (например, от $0,5\times10^6$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, до $1,25\times10^9$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR). В некоторых вариантах осуществления доза жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR (например, жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR для CD19, BCMA, CD20 или CD22), составляет приблизительно 1×10^6, приблизительно $2,5\times10^6$, приблизительно 5×10^6, приблизительно $1,25\times10^7$, приблизительно $2,5\times10^7$, приблизительно 5×10^7, приблизительно $5,75\times10^7$ или приблизительно 8×10^7 жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR.

Отбор пациентов

В некоторых вариантах осуществления любого из способов лечения субъекта или

композиции для применения, раскрытых в данном документе, у субъекта имеется рак, например, гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из лимфоцитарного лейкоза (CLL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), множественной миеломы, острого лимфоидного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфоидного лейкоза (BALL), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (TALL), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (SLL), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), DLBCL, ассоциированной с хроническим воспалением, хронического миелоидного лейкоза, миелопролиферативных новообразований, фолликулярной лимфомы, педиатрической фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы (экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны из лимфоидной ткани слизистых оболочек), лимфомы из клеток маргинальной зоны, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки, лимфомы/лейкоза селезенки, диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки, варианта волосатоклеточного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, болезни тяжелых цепей, плазмоклеточной миеломы, солитарной плазмоцитомы кости, внекостной плазмоцитомы, нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, педиатрической нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, первичной кожной лимфомы из клеток центра фолликула, лимфоматоидного гранулематоза, первичной медиастинальной (тимической) крупноклеточной В-клеточной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ALK+ крупноклеточной В-клеточной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастлемана, первичной выпотной лимфомы, В-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML) или неклассифицируемой лимфомы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующий и/или рефрактерный рак.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов лечения субъекта или композиции для применения, раскрытых в данном документе, у субъекта имеется CLL или SLL В некоторых вариантах осуществления субъекту, у которого имеется CLL или SLL, ранее вводили средство терапии на основе ингибитора BTK, например, ибрутиниб, в течение по меньшей мере 1-12 месяцев, например, 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления средство терапии на основе ингибитора BTK, например, средство терапии ибрутиниб, представляет собой средство терапии второй линии. В некоторых вариантах осуществления у субъекта наблюдался частичный ответ или наблюдалась стабилизация заболевания в ответ на средство терапии на основе ингибитора BTK. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не наблюдался ответ на средство терапии на основе

ингибитора BTK. В некоторых вариантах осуществления у субъекта развилась устойчивость, например, развились мутации, придающие устойчивость к ибрутинибу. В некоторых вариантах осуществления мутации, придающие устойчивость к ибрутинибу, включают мутацию в гене, кодирующем BTK, и/или гене, кодирующем PLCg2. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой взрослую особь, например, в возрасте по меньшей мере 18 лет.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов лечения субъекта или композиции для применения, раскрытых в данном документе, у субъекта имеется DLBCL, например, рецидивирующая и/или рефрактерная DLBCL. В некоторых вариантах осуществления субъекту, у которого имеется DLBCL, например, рецидивирующая и/или рефрактерная DLBCL, ранее вводили по меньшей мере 2 линии средств химиотерапии, например, средство терапии на основе антитела к CD20 и/или средство химиотерапии на основе антрациклина. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал средство терапии на основе стволовых клеток, например, средство терапии на основе аутологичных стволовых клеток, и у него не наблюдался ответ на указанное средство терапии на основе стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления субъект не соответствует критериям для применения средства терапии на основе стволовых клеток, например, средства терапии на основе аутологичных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой взрослую особь, например, в возрасте по меньшей мере 18 лет.

Биомаркеры для оценивания эффективности CAR

В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыт способ оценивания или мониторинга эффективности средства терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR (например, средства терапии на основе CAR для CD19 или BCMA), у субъекта (например, субъекта, у которого имеется рак, например, гематологический рак). Способ включает сбор данных о величине эффективности средства терапии на основе CAR, где указанная величина является показателем эффективности или пригодности средства терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR.

В ряде вариантов осуществления величина эффективности средства терапии на основе CAR у субъекта, у которого имеется CLL или SLL, включает показатель одного, двух, трех или всех из следующих параметров:

(i) мутации в гене, кодирующем BTK, в образце (например, образце, полученном путем афереза, или образце изготовленного продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR);

(ii) мутации в гене, кодирующем PLCg2, в образце (например, образце, полученном путем афереза, или образце изготовленного продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR);

(iii) минимального остаточного заболевания, например, оцененного по уровню и/или активности CD8, CD4, CD3, CD5, CD19, CD20, CD22, CD43, CD79b, CD27,

CD45RO, CD45RA, CCR7, CD95, LAG3, PD-1, TIM-3 и/или CD81; или оцененного с помощью глубокого секвенирования иммуноглобулинов; в образце (например, образце, полученном путем афереза, или образце опухоли от субъекта); или

(iv) уровня или активности одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или всех из цитокинов, выбранных из IFN-g, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNF-a, IP-10, MCP1, MIP1a, в образце, например, образце, полученном путем афереза, от субъекта.

В ряде вариантов осуществления величина эффективности средства CAR-терапии у субъекта, у которого имеется DLBCL, например, рецидивирующая и/или рефрактерная DLBCL, включает показатель одного или обоих из следующих параметров:

(i) минимального остаточного заболевания, например, оцененного по уровню и/или активности CD8, CD4, CD19, CD3, CD27, CD45RO, CD45RA, CCR7, CD95, LAG3, PD-1 и/или TIM-3; или оцененного с помощью глубокого секвенирования иммуноглобулинов; в образце (например, образце, полученном путем афереза, или образце опухоли от субъекта); или

(ii) уровня или активности одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или всех из цитокинов, выбранных из IFN-g, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNF-a, IP-10, MCP1, MIP1a, в образце (например, образце, полученном путем афереза, от субъекта).

В других вариантах осуществления величина эффективности средства CAR-терапии дополнительно включает показатель одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или более (всех) из следующих параметров:

(i) уровня или активности одного, двух, трех или более (например, всех) из покоящихся T_{EFF}-клеток, покоящихся T_{REG}-клеток, более молодых Т-клеток (например, необученных Т-клеток (например, необученных CD4 или CD8 Т-клеток, необученных гамма/дельта-Т-клеток)), или стволовых Т-клеток памяти (например, стволовых CD4 или CD8 Т-клеток памяти или стволовых гамма/дельта-Т-клеток памяти), или ранних Т-клеток памяти или их комбинации в образце (например, образце, полученном путем афереза, или образце изготовленного продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR);

(ii) уровня или активности одного, двух, трех или более (например, всех) из активированных T_{EFF}-клеток, активированных T_{REG}-клеток, более старых Т-клеток (например, более старых CD4 или CD8 клеток) или поздних Т-клеток памяти или их комбинации в образце (например, образце, полученном путем афереза, или образце изготовленного продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR);

(iii) уровня или активности маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или более ингибиторов контрольных точек иммунного ответа (например, PD-1, PD-L1, TIM-3, TIGIT и/или LAG-3), в образце (например, образце, полученном путем афереза, или образце изготовленного продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка имеет фенотип истощения, например, совместно экспрессирует по меньшей мере два маркера истощения, например,

совместно экспрессирует PD-1 и TIM-3. В других вариантах осуществления иммунная клетка имеет фенотип истощения, например, совместно экспрессирует по меньшей мере два маркера истощения, например, совместно экспрессирует PD-1 и LAG-3;

(iv) уровня или активности CD27 и/или CD45RO- (например, CD27+ CD45RO-) иммунных эффекторных клеток, например, в популяции CD4+ или CD8+ Т-клеток, в образце (например, образце, полученном путем афереза, или образце изготовленного продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR);

(v) уровня или активности одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати или всех из биомаркеров, выбранных из CCL20, IL-17a, IL-6, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1;

(vi) уровня или активности цитокинов (например, качества репертуара цитокинов) в образце продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, например, образце продукта на основе клеток, экспрессирующих CLL-1; или

(vii) эффективности трансдукции клетки, экспрессирующей CAR, в образце изготовленного продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, средство терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR, содержит множество (например, популяцию) иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR, например, множество (например, популяцию) Т-клеток или NK-клеток или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR, представляет собой средство терапии на основе CAR для CD19.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, показатель одного или нескольких параметров, раскрытых в данном документе, получают из образца, полученного путем афереза, взятого у субъекта. Образец, полученный путем афереза, можно оценить перед инфузией или повторной инфузией.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, показатель одного или нескольких параметров, раскрытых в данном документе, получают из образца опухоли, взятого у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, показатель одного или нескольких параметров, раскрытых в данном документе, получают из образца изготовленного продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, например, образца продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR для CD19. Изготовленный продукт на основе клеток, экспрессирующих CAR, можно оценить перед инфузией или повторной инфузией.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, оценивание субъекта проводят перед получением, во время или после получения средства терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, по показателю одного или нескольких параметров, раскрытых в данном

документе, оценивается профиль одного или нескольких из экспрессии гена, проточной цитометрии или экспрессии белка.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, способ дополнительно включает идентификацию субъекта как пациента, отвечающего на лечение, пациента, не отвечающего на лечение, пациента с рецидивом или пациента без рецидива на основании показателя одного или нескольких из параметров, раскрытых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, пациент, отвечающий на лечение, например, пациент с полным ответом на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокую, например, статистически значимо более высокую процентную долю CD8+ Т-клеток по сравнению с эталонным значением, например, процентной долей CD8+ Т-клеток у пациента, не отвечающего на лечение.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, пациент, отвечающий на лечение, например, пациент с полным ответом на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокую процентную долю CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток, например, в популяции CD8+, по сравнению с эталонным значением, например, количеством CD27+ CD45RO- иммунных эффекторных клеток у пациента, не отвечающего на лечение.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, пациент, отвечающий на лечение, например, пациент с полным ответом на лечение или пациент с частичным ответом на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокую, например, статистически значимо более высокую, процентную долю CD4+ Т-клеток по сравнению с эталонным значением, например, процентной долей CD4+ Т-клеток у пациента, не отвечающего на лечение.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, пациент, отвечающий на лечение, например, пациент с полным ответом на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокую процентную долю одного, двух, трех или более (например, всех) из покоящихся T_{EFF}-клеток, покоящихся T_{REG}-клеток, более молодых Т-клеток или ранних Т-клеток памяти или их комбинации по сравнению с эталонным значением, например, количеством покоящихся T_{EFF}-клеток, покоящихся T_{REG}-клеток, более молодых Т-клеток или ранних Т-клеток памяти у пациента, не отвечающего на лечение.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, пациент, не отвечающий на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокую процентную долю одного, двух, трех или более (например, всех) из активированных T_{EFF}-клеток, активированных T_{REG}-клеток, более старых Т-клеток (например, более старых CD4 или CD8 клеток) или поздних Т-клеток памяти или их комбинации по сравнению с эталонным значением, например, количеством активированных T_{EFF}-клеток, активированных T_{REG}-клеток, более старых Т-клеток

(например, более старых CD4 или CD8 клеток) или поздних Т-клеток памяти у пациента, отвечающего на лечение.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, пациент, не отвечающий на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокий процентный уровень маркера истощения иммунных клеток, например, одного, двух или более ингибиторов контрольных точек иммунного ответа (например, PD-1, PD-L1, TIM-3, TIGIT и/или LAG-3). В некоторых вариантах осуществления пациент, не отвечающий на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокую процентную долю иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих PD-1, PD-L1 или LAG-3 (например, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток) (например, CD4+ клеток и/или CD8+ Т-клеток, экспрессирующих CAR), по сравнению с процентной долей иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих PD-1 или LAG-3, у пациента, отвечающего на лечение.

В некоторых вариантах осуществления пациент, не отвечающий на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокую процентную долю иммунных клеток, имеющих фенотип истощения, например, иммунных клеток, которые совместно экспрессируют по меньшей мере два маркера истощения, например, совместно экспрессируют PD-1, PD-L1 и/или TIM-3. В других вариантах осуществления пациент, не отвечающий на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокую процентную долю иммунных клеток, имеющих фенотип истощения, например, иммунных клеток, которые совместно экспрессируют по меньшей мере два маркера истощения, например, совместно экспрессируют PD-1 и LAG-3.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, пациент, не отвечающий на лечение, имеет или идентифицирован как имеющий более высокую процентную долю PD-1/PD-L1+/LAG-3+ клеток в популяции клеток, экспрессирующих CAR (например, популяции CLL-1-CAR+ клеток), по сравнению с пациентом, отвечающим на лечение (например, пациентом с полным ответом на лечение) с помощью средства терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, у пациента, отвечающего на лечение (например, пациента с полным или частичным ответом на лечение), имеются один, два, три или больше (или все) из следующих профилей:

(i) имеется большее количество CD27+ иммунных эффекторных клеток по сравнению с эталонным значением, например, количеством CD27+ иммунных эффекторных клеток у пациента, не отвечающего на лечение;

(ii) имеется большее количество CD8+ Т-клеток по сравнению с эталонным значением, например, количеством CD8+ Т-клеток у пациента, не отвечающего на лечение;

(iii) имеется меньшее количество иммунных клеток, экспрессирующих один или несколько ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, например, ингибиторов

контрольных точек иммунного ответа, выбранных из PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 или KLRG-1 или их комбинации, по сравнению с эталонным значением, например, количеством клеток, экспрессирующих один или несколько ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, у пациента, не отвечающего на лечение; или

(iv) имеется большее количество одного, двух, трех, четырех или более (всех) из покоящихся T_{EFF}-клеток, покоящихся T_{REG}-клеток, необученных CD4 клеток, нестимулированных клеток памяти или ранних Т-клеток памяти или их комбинации по сравнению с эталонным значением, например, количеством покоящихся T_{EFF}-клеток, покоящихся T_{REG}-клеток, необученных CD4 клеток, нестимулированных клеток памяти или ранних Т-клеток памяти у пациента, не отвечающего на лечение.

В ряде вариантов осуществления субъект, который является пациентом, отвечающим на лечение, пациентом, не отвечающим на лечение, пациентом с рецидивом или пациентом без рецидива, идентифицированным посредством способов, изложенных в данном документе, может быть подвергнут дополнительной оценке в соответствии с клиническими критериями. Например, пациент с полным ответом на лечение является субъектом или идентифицирован как субъект, у которого имеется заболевание, например, рак, у которого проявляется полный ответ на лечение, например, полная ремиссия. Полный ответ на лечение можно идентифицировать, например, с помощью NCCN Guidelines® или руководства, утвержденного на Международном семинаре по хроническому лимфоцитарному лейкозу (iwCLL) 2018 года, как раскрыто в Hallek M et al., Blood (2018) 131:2745-2760 "iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL", полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Пациент с частичным ответом на лечение является субъектом или идентифицирован как субъект, у которого имеется заболевание, например, рак, у которого проявляется частичный ответ на лечение, например, частичная ремиссия. Частичный ответ можно идентифицировать, например, с помощью критериев NCCN Guidelines® или iwCLL 2018 года, как описано в данном документе. Пациент, не отвечающий на лечение, является субъектом или идентифицирован как субъект, у которого имеется заболевание, например, рак, у которого не проявляется ответ на лечение, например, у пациента наблюдается стабилизация заболевания или прогрессирование заболевания. Пациента, не отвечающего на лечение, можно идентифицировать, например, с помощью критериев NCCN Guidelines® или iwCLL 2018 года, как описано в данном документе.

В качестве альтернативы или в комбинации со способами, раскрытыми в данном документе, с учетом указанной величины осуществляется одно, два, три, четыре или более из следующего:

введения, например, пациенту, отвечающему на лечение, или пациенту без рецидива средства терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR;

введения измененных доз средства терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR;

изменения схемы или периода введения средства терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR;

введения, например, пациенту, не отвечающему на лечение, или пациенту с частичным ответом на лечение дополнительного средства в комбинации со средством терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR, например, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, например, ингибитора контрольной точки иммунного ответа, описанного в данном документе;

введения пациенту, не отвечающему на лечение, или пациенту с частичным ответом на лечение средства терапии, которое обеспечивает увеличение количества более молодых Т-клеток у субъекта, перед проведением лечения с помощью средства терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR;

модификации способа изготовления средства терапии на основе клеток, экспрессирующих CAR, например, обогащения более молодыми Т-клетками перед введением нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, или увеличения эффективности трансдукции, например, у субъекта, идентифицированного как пациент, не отвечающий на лечение, или пациент с частичным ответом на лечение;

введения альтернативного средства терапии, например, пациенту, не отвечающему на лечение, или пациенту с частичным ответом на лечение, или пациенту с рецидивом; или,

в случае, если субъект является пациентом, не отвечающим на лечение, или пациентом с рецидивом или идентифицирован в таковом качестве, уменьшения популяции T_{REG}-клеток и/или уровня экспрессии генной сигнатуры T_{REG}, например, посредством одного или нескольких из истощения по CD25, введения циклофосфамида, антитела к GITR или их комбинации.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение дополнительно подробно описано посредством ссылки на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры приведены лишь в целях иллюстрации и не предполагаются как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, настоящее изобретение никоим образом не следует истолковывать как ограниченное следующими примерами, а, наоборот, следует истолковывать как охватывающее все без исключения видоизменения, которые становятся очевидными как следствие идеи, приведенной в данном документе.

Пример 1. Получение CART с помощью стимуляции цитокинами

Краткое описание

В данном примере описан способ изготовления CART, называемый "способом с использованием цитокинов". В некоторых вариантах осуществления клетки (например, Т-клетки) высевают в среды (например, среды, содержащие сыворотку, например, среды, содержащие 2% сыворотки). К клеткам добавляют один или несколько цитокинов (например, один или несколько цитокинов, выбранных из IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-21 или IL-6 (например, IL-6/sIL-6R)), а также векторов

(например, лентивирусных векторов), кодирующих CAR. После инкубирования в течение 20-24 часов клетки промывают, составляют и криоконсервируют. Иллюстративный способ с использованием цитокинов показан на фиг. 1A.

По сравнению с традиционным способом изготовления CART в данном пересмотренном способе исключается стимуляция CD3/CD28, а также размножение Т-клеток ex vivo. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что гранулы с антителами к CD3/CD28 запускают дифференцировку в центральные клетки памяти; и, в отличие от них, цитокины, такие как IL-15, IL-21 и IL-7, могут помогать сохранять недифференцированный фенотип трансдуцированных CD3+ Т-клеток. Как следствие, способ с использованием цитокинов, который не предусматривает активацию CD3/CD28, может обеспечивать получение CAR-Т-клеток с большей процентной долей необученных/стволовых Т-клеток по сравнению с CAR-Т-клетками, полученными с применением традиционного подхода.

Способы

После осуществления афереза в течение 24 часов после сбора Т-клетки очищали, и чистоту полученных Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Т-клетки замораживали и помещали в жидкий азот до тех пор, пока они не потребовались для использования.

В качестве альтернативы получают криоконсервированный образец, полученный путем афереза, и обогащают CD4+ Т-клетками и/или CD8+ Т-клетками с помощью устройства Prodigy®.

IL-7 и IL-15 получали при концентрации, в 1000 раз превышающей конечную требуемую концентрацию. IL-2 получали посредством 10-кратного разбавления в средах.

Таблица 19. Условия применения цитокинов

	Условия
1.	IL2
2.	IL-7
3.	IL-15
4.	IL2+IL7
5.	IL-7+IL-15
6.	IL2+IL-15
7.	Гранулы+IL2
8.	Гранулы+IL15

В условиях со стимуляцией гранулами для размножения расчеты проводили для посева клеток в конечной концентрации при соотношении гранул и клеток, составляющем 3:1. Магнитные гранулы Dynabeads® промывали дважды с применением Dynamag® и ресуспендировали в требуемом объеме среды для эксперимента. Промытые гранулы добавляли в пробирки, которые содержали конкретные цитокины и клетки.

Во время посева клетки трансдуцировали с помощью лентивирусного вектора при множественности заражения (MOI), составляющей 1. Конкретный объем вектора, подлежащего трансдукции, рассчитывали, исходя из множественности заражения (MOI) и концентрации (титра) применяемой партии вектора. Титр и MOI измеряли с использованием линий первичных Т-клеток.

В условиях, где цитокины использовались для стимуляции в отдельности, клетки ресуспендировали после промывания при концентрации 1E7/мл и добавляли в коническую пробирку, которая уже содержала цитокины в зависимости от условия (таблица 19). После добавления клеток и цитокинов добавляли лентивирусный вектор с последующим добавлением сред.

Во всех из условий клетки смешивали, и 1 мл высевали в 14 лунок 24-луночного планшета. Клетки помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO_2.

На следующий день клетки собирали, регистрировали концентрацию и жизнеспособность клеток. Их функцию измеряли с помощью анализа цитотоксичности и пролиферации по включению (EDU). Такие клетки называли "CART дня 1".

Клетки иммунофенотипировали в отношении статуса дифференцировки Т-клеток, и трансдукцию CAR оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки промывали, добавляли краситель для определения жизнеспособности с последующим добавлением коктейля антител (таблица 20), и планшеты инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. После инкубирования клетки промывали дважды и фиксировали перед анализом на BD Fortessa.

Таблица 20. Антигены панели антител, применяемых для определения статуса дифференцировки Т-клеток

Антиген
Жизнеспособность
CD3
CD4
CD8
HLADR
CD28
CD45RO
CD95
CCR7
Антиидиотипическое

Для определения того, сохраняли ли CART дня 1 по-прежнему способность размножаться после сбора, 5e6 клеток/условие размножали с применением гранул с антителами к CD3/CD28 в колбе T25 при соотношении 3:1 (гранулы и клетки). Магнитные гранулы Dynabeads® промывали, как описано ранее. Среды не содержали цитокинов.

Клетки помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO_2.

В случае, если Т-клетки размножали с помощью гранул с антителами к CD3/CD28 каждые 2 дня, то клетки подсчитывали и разделяли в течение не более 10 дней в культуре. В день 10 клетки собирали, подсчитывали, иммунофенотипировали с помощью панели дифференцировки (таблица 20) и замораживали в CryoStor 10™. Клетки размораживали для функциональных анализов, которые включают анализ цитотоксичности, анализ пролиферации и анализ секреции цитокинов.

Клетки размножали в присутствии гранул с антителами к CD3/CD28 in vitro в течение 10 дней и называли "CART дня 10".

Результаты

При очистке Т-клетки инкубировали с цитокинами в отсутствие любых других стимулов для активации, и тогда наблюдалось увеличение уровня трансдукции с дня 1 до дня 4 (фиг. 1B). Независимо от момента времени и условия применения цитокинов преобладающая популяция в CAR-положительной популяции представляла собой популяцию необученных клеток (фиг. 1D, 1E и 1F). Исключение средства для активации приводило к усилению трансдукции примитивной популяции. Примечательно, что воздействие IL-2 или IL-15 обеспечивало поддержание самообновляющихся Т-клеток in vitro (фиг. 1G). Подобное явление наблюдали при других тестируемых видах обработки цитокинами (IL-7; IL2+IL7; IL-7+IL-15 и IL2+IL-15) (данные не показаны). Способ с использованием цитокинов (с использованием IL2 или IL-15 в данном конкретном примере) обеспечивал сохранение или незначительное увеличение процентной доли CD45RO- CCR7+ клеток (фиг. 1G). Сходные данные показаны на фиг. 1H и 1I для IL-2, IL-15 и комбинации IL-7 и IL-15. Культивирование Т-клеток с указанными цитокинами в течение 24 часов обеспечивало сохранение фенотипа необученных CD3+ Т-клеток и снижение процентной доли центральных Т-клеток памяти (фиг. 1H и 1I).

Чтобы убедиться в том, что трансдукция, наблюдаемая в течение 24 часов, была стабильной, CART, полученные в течение 24 часов, промывали для удаления любого остаточного вируса и размножали в течение 10 дней с применением гранул с антителами к CD3/CD28 для размножения. Размножившиеся клетки демонстрировали уровень трансдукции, почти эквивалентный уровню трансдукции у CART дня 1, что указывало на то, что трансдукция была стабильной (фиг. 2A). 2A).

Функциональные свойства CART дня 1 и CART дня 10 тестировали с помощью анализа цитотоксичности, высвобождения цитокинов и пролиферации. Клетки-мишени представляли собой клетки Nalm6 - линию клеток B-клеточного ALL, которая экспрессирует CD19. Анализ цитотоксичности демонстрировал, что CART дня 1 после размножения были эквивалентными при уничтожении в сравнении с CART дня 10 (фиг. 2B), даже несмотря на то, что с помощью CART дня 1 было трансдуцировано гораздо меньше клеток. Те же CART дня 1, которые размножились, сравнивали в отношении секреции IFN-гамма, и было обнаружено, что они характеризуются более низкой секрецией IFN-гамма по сравнению с CART дня 10 (фиг. 2C), что, вероятно, было

обусловлено различием в количестве трансдуцированных клеток. В отдельных исследованиях, где CART дня 1 характеризовались более высоким уровнем трансдукции, они секретировали IFN-гамма на более высоком уровне (данные не показаны). Кроме того, CART дня 1 из всех условий обработки, за исключением условия с IL7 в отдельности, демонстрировали сходную или более высокую пролиферацию по сравнению с CART дня 10 (фиг. 2D). Данные, показанные на фиг. 2D, не были нормализованы по уровням трансдукции.

Хотя для CART дня 10 наблюдалась стабильная трансдукция, эффективность была неизменно ниже. Титрование с увеличением множественности заражения (MOI) лентивирусным вектором тестировали при четырех условиях применения цитокинов, и при всех тестируемых условиях наблюдалась линейная зависимость от уровня трансдукции (фиг. 3A).

Кроме того, разные составы сред (главным образом со снижением концентрации сыворотки от 5% до 2% и до отсутствия сыворотки) сравнивали для определения их влияния на эффективность трансдукции. Снижение концентрации сыворотки до 2% человеческой сыворотки приводило к наиболее высокой эффективности трансдукции (фиг. 3B). Считалось, что добавление GlutaMAX в отдельности также имеет значительное влияние на эффективность трансдукции.

Далее CART дня 1 и CART дня 10 исследовали в отношении их противоопухолевой активности in vivo с использованием мышиной модели ALL. Вкратце, CART дня 1 и CART дня 10 были изготовлены, как описано выше, с жизнеспособностью, превышающей 80% (фиг. 4A и 4B). CART вводили мышам, несущим опухоль, и отслеживали в отношении размножения in vivo. Как показано на фиг. 4C, CART дня 1 демонстрировали более высокий уровень размножения in vivo, чем их аналоги дня 10. В частности, CART, изготовленные в присутствии IL-2, демонстрировали наиболее высокий уровень размножения in vivo (фиг. 4C). Все тестируемые CART ингибировали рост опухоли in vivo, хотя CART дня 1 демонстрировали замедленную кинетику по сравнению с CART дня 10 (фиг. 4D). У этого конкретного донора условие с IL2 демонстрировало наиболее высокую способность устранять опухоль in vivo (фиг. 4D).

Кроме того, его тестировали в отношении возможности масштабирования данного способа изготовления. Очищенные Т-клетки из замороженного образца, полученного путем афереза, трансдуцировали с помощью CAR для CD19 в 24-луночном планшете либо мешке PL30 после обогащения в присутствии IL2 либо hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra). hetIL-15 был описан в WO 2014/066527, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, и содержит IL-15 человека в комплексе с растворимой формой IL-15Ra человека. Клетки собирали спустя 24 часа и тестировали в отношении экспрессии CAR. Как показано на фиг. 5B, влияние на трансдукцию не наблюдалось при масштабировании способа от 24-луночного планшета до мешка PL30 в присутствии IL2 либо hetIL-15.

Пример 2. Получение CART с помощью стимуляции TCR

Краткое описание

В данном примере описан способ изготовления CART, называемый "способом с использованием активации". В некоторых вариантах осуществления клетки (например, Т-клетки) высевают в среды (например, бессывороточные среды, например, среды OpTmizer™), содержащие IL-2 (например, среды OpTmizer™, содержащие добавку OpTmizer™, GlutaMAX и 100 МЕ/мл IL-2), помещают в устройство для культивирования клеток и приводят в контакт с антителами к CD3/CD28 (например, TransAct). Через 12 часов вектор (например, лентивирусный вектор), кодирующий CAR, добавляют к клеткам, и клетки возвращают в инкубатор. Через 24 часа после начала культивирования клеток клетки собирают, из них отбирают образцы и осуществляют составление. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что кратковременная активация CD3 и CD28, например, с помощью антител к CD3/CD28 (например, TransAct), способствует эффективной трансдукции самообновляющихся Т-клеток.

В данном и других примерах применяли способ изготовления CART, называемый "способом традиционного изготовления (TM)", в качестве контроля. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отбирают из свежих или криоконсервированных образцов, полученных путем лейкафереза (например, с применением положительного или отрицательного отбора), активируют (например, с помощью Dynabeads®, покрытых антителами к CD3/CD28), приводят в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу CAR (например, трансдуцируют с помощью лентивирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу CAR), и размножают in vitro в течение, например, 7, 8, 9, 10 или 11 дней. В данном примере представлен иллюстративный способ TM в качестве способов, применяемых для изготовления клеток с CAR из контрольных групп d9.

Способы

В некоторых вариантах осуществления способ с использованием активации, предусмотренный в данном документе, начинается с замороженного или свежего продукта лейкафереза. После получения образца для подсчета и QC продукт соединяют с устройством для сортировки клеток (например, установленным набором устройства CliniMACS® Prodigy®) и запускают программу. Клетки промывают и инкубируют с микрогранулами, которые связываются с требуемым поверхностным маркером или маркерами (такими как CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RO, CCR7, CD62L, CD14, CD34, CD95, CD19, CD20, CD22 и/или CD56). Меченные гранулами клетки отбирают путем пропускания клеток через магнитную колонку. При необходимости клетки можно дополнительно разделять путем инкубирования отрицательной фракции с гранулами, которые связываются со вторым набором поверхностных маркеров (таких как CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RO, CCR7, CD62L, CD14, CD34, CD95, CD19, CD20, CD22 и/или CD56) и пропускания клеток вновь через колонку с магнитным разделением. Выделенные клетки снова промывают, и среды для клеток заменяют буфером для разделения. Очищенные клетки затем переносят в культуру либо криоконсервируют для

последующего применения. Криоконсервированные клетки можно размораживать, промывать в предварительно нагретых средах для клеток и ресуспендировать в средах для клеток. Свежие клетки можно добавлять непосредственно в культуру. Клетки высевают в мембранные биореакторы при 0,4-1,2e6 клеток/см^2 мембраны, добавляют активирующий реагент, такой как гранулы/полимеры, содержащие антитела к CD3/CD28, наночастицы или коллоидные наносистемы (и/или любой из следующих коактиваторов в отдельности или в комбинации: реагент, стимулирующий ICOS, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2 или CD226), и среду для клеток добавляют в конечном объеме 0,25-2 мл/см^2 мембраны. Вектор (например, лентивирусный вектор), кодирующий CAR, добавляют незамедлительно или не более чем через 18 часов после начала культивирования. Клетки инкубируют с вектором и активирующим реагентом, описанным выше, в общей сложности в течение 24 часов после начала культивирования. После того, как культивирование продолжалось в течение 24 часов, клетки ресуспендируют механически посредством взбалтывания, или пипетирования, или перемешивания другим образом, и каркасы стимулирующих реагентов растворяют с помощью подходящих буферов. Клетки промывают для удаления нежелательных реагентов и повторно составляют в среде для криоконсервации. Клетки криоконсервируют до тех пор, пока они не понадобятся для введения.

Для исследований, относящихся к фиг. 6A-6C, применяли следующий протокол.

Клетки очищали из свежей ¼ лейкоцитарной массы с применением автоматизированной системы разделения в Ficoll (Sepax 2, BioSafe) для получения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Такие PBMC дополнительно очищали с применением иммуномагнитного отрицательного отбора (набор для отрицательного отбора общей популяции Т-клеток, Miltenyi) для получения CD3 Т-клеток высокой чистоты (98-100%). Такие клетки помещали в культуру с полной средой OpTmizer™ (Thermo) (составлены согласно листку-вкладышу в упаковке и дополнены IL-2 при 100 МЕ/мл (Proleukin, Prometheus)) и активирующим реагентом на основе антител к CD3/CD28 в рекомендуемой дозе (TransAct, Miltenyi) в мембранном биореакторе. Клетки затем инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 12 часов для активации. Клетки удаляли из инкубатора, и в культуры добавляли свежеразмороженный лентивирусный вектор при множественности заражения (MOI), составляющей 2,5 т. е./клетка. Клетки возвращали в инкубатор для трансдукции в течение еще 12 часов. Клетки собирали, промывали дважды средой и составляли непосредственно в стерильном PBS (Invitrogen) и инъецировали мышам NSG через хвостовую вену. Клетки из контрольных групп d9 выращивали в колбах (T25-T225, Corning) с использованием среды RPMI (Thermo), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Seradigm) (полной среды, также известной как "R10"), и Dynabeads® для размножения с антителами к CD3/CD28 (Thermo) в количестве 3 гранул на Т-клетку. Клетки затем инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 24 часов для активации. Клетки удаляли из инкубатора, и в культуры добавляли свежеразмороженный лентивирусный вектор при MOI, составляющей 2,5 т. е./клетка. Клетки возвращали в

инкубатор на дополнительные 7 дней, разделяя каждые 2 дня для поддержания концентрации 5e5 клеток/мл. Размножившиеся клетки переносили в центрифужные пробирки на 50 мл (Corning) и подвергали двум циклам удаления гранул с помощью магнитного штатива (Dynamag-50, Thermo). Клетки, от которых были удалены гранулы, затем дважды промывали с помощью среды и составляли со средой для криоконсервации CryoStor10 (STEMCELL Technologies), криоконсервировали с помощью устройства CoolCell (BioCision) и выдерживали в паровой фазе жидкого азота в течение минимум 48 часов. Клетки размораживали в предварительно нагретой среде R10, промывали дважды средой, затем составляли в стерильном PBS (Invitrogen) и инъецировали мышам NSG через хвостовую вену.

Мышам NSG возрастом 6-8 недель (NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJl, Jackson Labs) инъецировали опухолевые клетки NALM6, трансдуцированные люциферазой (ATCC CRL-3273, ATCC), при 1e6 клеток/мышь за 4 дня до инъекции CART без предварительного кондиционирования. Вводили CAR-T-клетки, составленные в PBS, при 2e6, 5e5 или 2e5 CAR+-клеток на мышь NSG, или соответствующую дозу нетрансдуцированных размножившихся Т-клеток, или контрольную среду-носитель, представляющую собой PBS. Мышей отслеживали с помощью еженедельного взятия крови, визуализации люциферазы каждые две недели (Xenogen IVIS, PerkinElmer) и измерений массы тела каждые две недели. Всех животных отслеживали в отношении признаков токсичности (потери массы тела, состояния агонии) и умерщвляли, если симптомы проявлялись. Всех выживших мышей умерщвляли по окончании исследования (неделя 5), и получали образцы терминальной крови, костного мозга и селезенки. Исследование проводили в соответствии с IACUC и всеми другими применимыми руководствами.

Результаты

CAR-T-клетки получали посредством способа с использованием активации, описанного выше, и определяли характеристики их противоопухолевой активности in vivo в мышиной модели ALL. Как показано на фиг. 6A-6C, CAR-T-клетки, изготовленные посредством способа с использованием активации, демонстрировали сильную противоопухолевую активность in vivo.

Пример 3. Экспрессия IL6R на Т-клетках и эффект цитокинов в отношении размножения Т-клеток

Материалы и способы

Культивирование Т-клеток

Ранее замороженные Т-клетки размораживали и приводили в контакт с Dynabeads αCD3/αCD28 (соотношение клеток и гранул составляет 1 к 3) в присутствии указанных цитокинов в день 0. С дня 3 добавляли в два раза больше среды для роста Т-клеток (RPMI1640, 10% FBS, 2 мМ L-глутамина, 100 мкМ заменимых аминокислот, 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ HEPES, 55 мкМ β-меркаптоэтанола, 10% FBS и 100 ед./мл смеси пенициллин-стрептомицин) в планшет с указанными цитокинами (без цитокинов, rhIL2

(50 МЕ/мл, Novartis), IL6 (10 нг/мл, R&D Systems), IL7 (10 нг/мл, PeproTech), IL15 (10 нг/мл, PeproTech) и IL21 (10 нг/мл, PeproTech)) в день 3, 5, 6, 9, 12, 15 и 18. Клетки, обработанные без цитокинов, с помощью IL6 или IL21, культивировали до дня 18, и клетки, обработанные с помощью IL2, IL7 или IL15, культивировали до дня 25.

Поверхностное окрашивание клеток

Клетки собирали в указанные моменты времени и затем окрашивали с помощью красителя для определения живых и мертвых клеток (eFluro780, eBioscience), антител к CD3 (BioLegend, клон №: OKT3), CD4 (BioLegend, клон №: OKT4), CD8 (BD Bioscience, клон №: RPA-T8), CD45RO (BioLegend, клон №: UCHL1), CCR7 (BioLegend, клон №: G043H7), CD27 (BD Horizon, клон №: L128), CD127 (BioLegend, клон №: A019D5), CD57 (BioLegend, клон №: HCD57), CD126 (BioLegend, клон №: UV4) и CD130 (R&D Systems, клон №: 28126). Данные о клетках собирали с помощью FACS Fortessa, и затем применяли программу FlowJo для анализа данных.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов

Для исследования процентной доли клеток, продуцирующих цитокины, в день 25 Т-клетки собирали и затем быстро активировали с помощью PMA (50 нг/мл, Sigma-Aldrich) и иономицина (1 мкМ, Sigma-Aldrich) в течение 4 часов в присутствии брефельдина А (BioLegend) при 37°C в инкубаторе. Т-клетки затем окрашивали с помощью красителя для определения живых и мертвых клеток (eFluro780, eBioscience), антител к CD3 (BioLegend, клон №: OKT3), CD4 (BioLegend, клон №: OKT4), CD8 (BD Bioscience, клон №: RPA-T8) с последующей фиксацией и пермеабилизацией. Затем Т-клетки дополнительно окрашивали с помощью антител к IFN-γ (BioLegend, клон №: 4S.B3), IL-2 (BioLegend, MQ1-17H12) и TNF-a (BioLegend, Mab11). Данные о клетках собирали с помощью FACS Fortessa, и затем применяли программу FlowJo для анализа данных.

Результаты

Обогащение клетками, экспрессирующими IL6Rα и/или IL6Rβ, осуществляли в субпопуляциях менее дифференцированных Т-клеток как среди CD4, так и среди CD8 Т-клеток. Как показано на фиг. 7A и 7B, необученные CD4 и CD8 Т-клетки экспрессировали IL6Rα и IL6Rβ на более высоких уровнях, чем соответствующие Т-клетки памяти. Т-клетки, которые экспрессировали как IL6Rα, так и IL6Rβ, представляли собой преимущественно CD45RA+ CD45RO- CD27+ CD28+ клетки (фиг. 8A и 8B). При стимуляции TCR подавлялась экспрессия IL6Rα, но не IL6Rβ (фиг. 11).

Далее разные цитокины сравнивали в отношении их влияния на размножение Т-клеток. Среди тестируемых цитокинов IL15, IL2 и IL7 усиливали размножение Т-клеток, при этом IL15 демонстрировал наибольшее усиление (фиг. 12). Обработка цитокинами не влияла на размер (фиг. 13A) или жизнеспособность клеток (фиг. 13B). Обработка с помощью IL15 также усиливала размножение клеток, экспрессирующих IL6Rβ (фиг. 14). Клетки, экспрессирующие IL6Rβ, были представлены главным образом в CD27+ (фиг. 16) или CD57- (фиг. 17) субпопуляциях Т-клеток как среди CD4, так и среди CD8 в день 15

после взаимодействия TCR с его лигандом и продуцировали цитокины IL2, IFNγ и TNFα в день 25 после активации TCR (фиг. 18).

Пример 4. Получение CART с помощью стимуляции TCR для доклинических исследований

В день 0 отдельные операции инженерных прогонов для доклинических исследований начались с изготовления сред, используемых в день 0: буфера для способа быстрого изготовления и среды для способа быстрого изготовления (таблица 21). Буфер для способа быстрого изготовления (RB) содержит буфер CliniMACS® (Miltenyi) с 0,5% HSA. Среда для способа быстрого изготовления (таблица 21) была составлена в день 0 изготовления, и базовая среда содержит готовую для использования среду, называемую OpTmizer™, которая содержит GlutaMAX, IL-2, добавку CTS™ и ICSR. Устройство Prodigy® загружали для применения в день 0.

Таблица 21. Тип среды и точка применения в ходе изготовления CAR-T

Тип среды/буфера	Состав	Точка применения
Буфер для способа быстрого изготовления (RB)	Буфер CliniMACS® (+ 0,5% человеческого сывороточного альбумина (HSA))	День 0, обработка в устройстве для промывания/разделения клеток
Среда для способа быстрого изготовления (RM)	Среда OpTmizer™, CTS™, IL-2, GlutaMAX и ICSR	День 0 для обработки в устройстве для промывания/разделения клеток и высевания клеток
Буфер для собранного материала (HB) (также называемый буферным раствором для собранного материала)	PBS без EDTA с 2% HSA	Буфер для промывания собранного материала (день 1)
Среда для криоконсервации	Cryostor10 (CS10)	Составление собранного материала

Устройство Prodigy® загружали в день 0, материал, полученный путем лейкафереза, от здорового донора размораживали, и материал, полученный путем афереза, объединяли в мешке для переноса на 600 мл, который затем может быть присоединен к Prodigy®. IPC-образец экстрагировали из мешка для переноса на 600 мл и измеряли с помощью NC200 с получением как числа жизнеспособных клеток, так и процентного значения жизнеспособности для исходного материала, полученного путем афереза. После завершения загрузки Prodigy®, материал, полученный путем афереза, переносили в мешок для применения. После помещения продукта афереза в устройство Prodigy® после начала

программы ТСТ программа работала от 3 ч. 45 мин. до 4 ч. 15 мин. в зависимости от того, насколько много операций разделения методом положительного отбора она осуществляла. Программа ТСТ в день 0 обеспечивала вымывание DMSO в CentriCult с буфером для способа быстрого изготовления, осуществление промывания тромбоцитов, снижение объема, инкубирование образцов, полученных путем афереза, с микрогранулами с антителами к CD4 и CD8 в CentriCult и затем отбор Т-клеток с помощью микрогранул посредством положительного отбора с использованием магнита, установленного в Prodigy®. Отобранные Т-клетки с реагентами CD4 и CD8 элюировали в мешок для повторного применения со средой для способа быстрого изготовления. Образец для внутрипроизводственного контроля (IPC) отбирали из мешка для повторного применения для определения общего числа жизнеспособных клеток, доступных для высевания в сосуд для культивирования (G-Rex500MCS).

Устройство для культивирования G-Rex сначала загружали средой для способа быстрого изготовления, и затем добавляли целевой объем клеток из мешка для повторного применения в сосуд для культивирования. Затем в сосуд для культивирования добавляли активирующий реагент (TransAct). Затем в сосуд для культивирования после введения TransAct добавляли лентивирусный вектор, и осуществляли добавление вектора с использованием MOI, составляющей 1,0. Сосуд для культивирования G-Rex 500MCS затем промывали струей среды для способа быстрого изготовления до получения конечного объема среды 250 мл плюс объем добавляемого вектора. Сосуд для культивирования G-Rex затем помещали в инкубатор для обеспечения инкубирования культуры в течение целевого периода 24 ч. с диапазоном 20-28 часов.

После инкубирования в течение целевого периода 24 ч. культуру CART извлекали из инкубатора, и образец экстрагировали для получения числа жизнеспособных клеток и жизнеспособности культуры клеток перед промыванием собранного материала. Образец, отобранный при предварительном сборе, представлял собой IPC и применялся в качестве исходного образца в устройстве для промывания LOVO для определения скорости потока клеток через вращающуюся фильтрационную мембрану. В LOVO концентрация жизнеспособных WBC используется в качестве IPC. Применяемая программа для способа изготовления CART была описана как 4 промывания с помощью одного раствора, и в ней использовался буфер для собранного материала (PBS+2,0% HSA). В ходе промывания в LOVO мешок, содержащий IPC, использовали как для снижения объема, так и для промывания клеток с помощью буфера для собранного материала перед тем, как их наконец элюировали в мешок для выходного материала. Затем из мешка для выходного материала после промывания в LOVO отбирали образцы для получения числа и жизнеспособности жизнеспособных клеток с целью осуществления ручного центрифугирования в бутылке SaniSure и для осуществления конечных стадий конечного составления со средой для криоконсервации.

Пример 5. Получение BCMA-CART с применением способа быстрого изготовления с активацией (ARM)

Краткое описание

В данном примере описан способ изготовления CART, называемый "быстрым изготовлением с активацией (ARM)". В некоторых вариантах осуществления клетки (например, Т-клетки) культивируют в устройстве для культивирования клеток, содержащем среды (например, бессывороточные среды, например, среды OpTmizer™), рекомбинантный IL-2 человека (например, среды OpTmizer™, содержащие добавку OpTmizer™, GlutaMAX и 100 МЕ/мл IL-2), антитела к CD3/CD28 (например, TransAct) и вектор (например, лентивирусный вектор), кодирующий CAR для BCMA. Через 24 часа клетки, называемые "продуктом на основе CART дня 1", собирают, из них отбирают образцы и осуществляют составление. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что кратковременная активация CD3 и CD28, например, с помощью антител к CD3/CD28 (например, TransAct), способствует эффективной трансдукции самообновляющихся Т-клеток. В некоторых случаях некоторые клетки собирают через 48 ч., 72 ч. и 96 ч. или 7 дней после культивирования для измерения кинетики экспрессии CAR для BCMA in vitro. Ответы, обеспечиваемые CART дня 1, включают без ограничения цитолитическую активность и размножение in vivo.

Получение BCMA-CART дня 1 с применением способа ARM

В некоторых вариантах осуществления способ с использованием активации, предусмотренный в данном документе, начинается с замороженного или свежего продукта лейкафереза. После получения образца для подсчета и QC продукт соединяют с устройством для сортировки клеток (например, установленным набором устройства CliniMACS® Prodigy®) и запускают программу. Клетки промывают и инкубируют с микрогранулами, которые связываются с требуемыми поверхностными маркерами, такими как CD4 и CD8. Меченные гранулами клетки отбирают путем пропускания клеток через магнитную колонку. Выделенные клетки снова промывают, и среды для клеток заменяют буфером для разделения. Очищенные Т-клетки затем переносят в культуру либо криоконсервируют для последующего применения. Чистота выделенных Т-клеток проходит стадию QC посредством оценки с помощью проточной цитометрии. Криоконсервированные клетки можно размораживать, промывать в предварительно нагретых средах для клеток и ресуспендировать в средах для клеток. Свежие клетки можно добавлять непосредственно в культуру. Клетки высевают в мембранные биореакторы при 0,4-1,2e^6 клеток/см^2 мембраны, добавляют активирующий реагент, такой как гранулы/полимеры, содержащие антитела к CD3/CD28, наночастицы или коллоидные наносистемы, и среду для клеток добавляют в конечном объеме 0,25-2 мл/см^2 мембраны. Во время посева клетки трансдуцируют с помощью лентивирусного вектора, кодирующего CAR для BCMA, при различных значениях множественности заражения (MOI). Титр и MOI измеряют с использованием линий клеток, таких как SupT1. Через 24 часа клетки промывают для удаления ненужных реагентов перед окрашиванием для измерения экспрессии CAR с помощью проточной цитометрии и повторно составляют в среде для криоконсервации в виде "продукта на основе CART дня 1" для исследования in

vivo.

В данном примере описано получение и определение характеристик Т-клеток, экспрессирующих CAR R1B6, R1F2, R1G5, PI61, B61-02, B61-10 или Hy03 для BCMA, изготовленных с применением способа ARM. Последовательности R1B6, R1F2 и R1G5 раскрыты в таблицах 3-6. Последовательности PI61, B61-02 и B61-10 раскрыты в таблицах 7-11. Последовательности Hy03 раскрыты в таблицах 12-15.

Через двадцать четыре часа после того, как Т-клетки трансдуцировали с помощью лентивирусных векторов, кодирующих CAR для BCMA, при MOI, составляющей 2,5, экспрессию CAR измеряли с помощью проточной цитометрии с использованием rBCMA_Fc. Как показано на фиг. 19A, наблюдалось, что вся популяция живых CD3+ Т-клеток смещалась вправо в разной степени. Клетки, трансдуцированные таким образом, чтобы они экспрессировали R1G5, R1B6 или PI61, демонстрировали наиболее высокую экспрессию CAR (фиг. 19A). Этот паттерн экспрессии, измеренный с помощью проточной цитометрии, отличался от типичных гистограмм проточной цитометрии клеток, трансдуцированных таким образом, чтобы они экспрессировали CAR, где CAR-положительная популяция отчетливо отделяется от отрицательной популяции. На фиг. 19A показано то, что может иметь место "псевдотрансдукция или транзиентная экспрессия", выявляемая с помощью rBCMA_Fc, что не всегда указывает на действительную экспрессию генов. Ранее сообщалось, что лентивирусная псевдотрансдукция наблюдалась, начиная от момента добавления вектора, и продолжалась вплоть до 24 часов в CD34+ клетках и вплоть до 72 часов в клетках 293 (Haas DL, et al. Mol Ther. 2000. 291. 71-80). Дефектный по интегразе лентивирусный вектор вызывал транзиентную экспрессию eGFP в течение вплоть до 10 дней в CD34+ клетках и в течение вплоть до 14 дней в клетках 293. Несмотря на то, что лентивирусная псевдотрансдукция не была тщательно изучена в Т-клетках, данную возможность транзиентной экспрессии в такой короткий период времени нельзя было исключать. Следовательно, исследование кинетики in vitro проводили для измерения экспрессии CAR в клетках, изготовленных с применением ARM, указанных ниже.

Исследование кинетики экспрессии CAR in vitro клетками, изготовленными с применением способа ARM

В исследовании, описанном в данном документе, изучается, как клетки, изготовленные с применением способа ARM, экспрессируют молекулы CAR с течением времени. Вкратце, Т-клетки, полученные от здорового донора, изготавливали таким образом, чтобы они экспрессировали CAR для BCMA, с применением способа ARM при MOI, составляющей 1, и поддерживали в культуре в течение различных периодов времени, и их собирали через 24 ч., 48 ч., 72 ч., 96 ч. и 7 дней для оценки кинетики экспрессии CAR с помощью проточной цитометрии с использованием rBCMA_Fc, меченного AF647. Понимание кинетики экспрессии CAR помогает найти суррогатный момент времени для действительной и стабильной экспрессии для исследования с сортировкой или клинической стратегии введения доз in vivo.

В день 1 паттерн экспрессии CAR у клеток, трансдуцированных при MOI, составляющей 1 (фиг. 20A), сходен с паттерном у клеток, трансдуцированных при MOI, составляющей 2,5 (фиг. 19A). При обоих условиях MOI демонстрировался паттерн псевдо- или транзиентной экспрессии в день 1 (фиг. 19A и 20A). Однако в день 2 положительная по rBCMA_Fc популяция начала отделяться от группы отрицательного контроля, представляющей собой UTD (фиг. 20A). В день 3 и день 4 положительная по rBCMA_Fc популяция, которая представляет собой клетки, экспрессирующие CAR для BCMA, и отсутствует в группе UTD, отчетливо проявлялась во всех группах, где клетки трансдуцировали таким образом, чтобы они экспрессировали CAR для BCMA. От дня 3 до дня 4% CAR+ был относительно стабильным для каждой конструкции CAR (фиг. 20B), при этом наиболее высокая MFI наблюдалась в день 3 (фиг. 20C) (клетки имели наибольший размер в этот момент времени). В соответствии с данными, показанными на фиг. 19A, клетки, трансдуцированные таким образом, чтобы они экспрессировали PI61, R1G5 и R1B6, характеризовались наиболее высокой экспрессией CAR (фиг. 20A). Примечательно, что клетки, трансдуцированные с помощью векторов, кодирующих R1F2 или Hy03, не демонстрировали транзиентную экспрессию CAR в день 1, но отчетливо экспрессировали молекулы CAR для BCMA позднее в день 3 и день 4 (фиг. 20A). В заключение, векторы, кодирующие различные CAR, могут характеризоваться разной кинетикой экспрессии CAR с течением времени, и день 3 был выбран в качестве суррогатного момента времени для оценки экспрессии CAR.

Оценивание функциональных свойств in vivo BCMA-CART дня 1, полученных посредством способа ARM

CART дня 1 исследовали в отношении их противоопухолевой активности in vivo с использованием ксенотрансплантатной мышиной модели диссеминированной множественной миеломы из KMS-11-luc. Репортер люцифераза позволяет проводить мониторинг бремени заболевания посредством количественной биолюминесцентной визуализации (BLI). Вкратце, CART дня 1, изготовленные согласно описанному выше, вводили мышам, несущим опухоль. В первом исследовании in vivo (фиг. 21A и 21B) каждая мышь получала конечный продукт на основе CART в дозе, составляющей 1,5E6 клеток. Экспрессию CAR анализировали в день 1 и день 7 (фиг. 21A). В исследовании эффективности in vivo клетки, экспрессирующие PI61, R1G5 или R1B6, демонстрировали сильные формы противоопухолевой активности (фиг. 21B). Клетки, экспрессирующие R1F2, демонстрировали замедленную эффективность (фиг. 21B). В группе UTD также демонстрировалась частичная противоопухолевая активность через 14 дней после инъекции CART, которая могла быть обусловлена аллореактивностью (фиг. 21B). Во втором исследовании in vivo тестировали подбор дозы CAR+ T-клеток. Дозы CAR+ T-клеток определяли на основании % CAR+ в день 3 (фиг. 22A). Кинетику поглощения опухолью отслеживали дважды в неделю путем измерения с помощью BLI. На фиг. 22A показана экспрессия CAR, выявленная в день 1 и день 3. Результаты in vivo указывают на то, что все три клона PI61, R1B6 и R1G5 в обоих из доз, составляющих 1,5e5 CAR+ T-

клеток и 5e4 CAR+ Т-клеток, были способны обеспечивать отторжение опухоли и очищение от нее, как показано на фиг. 22B. На фиг. 22C показаны изменения массы тела на протяжении данного исследования, демонстрирующие отсутствие указания на GVHD.

Пример 6. Кинетика CART, полученных посредством способа быстрого изготовления, собранных в промежутке 12-24 часа

Введение

Для определения того, может ли продукт на основе CART, полученный посредством способа быстрого изготовления, быть получен за менее чем 24 часа, определяли характеристики кинетики для сбора CART, полученных посредством способа быстрого изготовления, полученных после 12-24 часов в культуре. Данное оценивание проводили в малом масштабе с использованием Т-клеток, обогащенных из криоконсервированного продукта афереза от здорового донора, с одновременным добавлением активирующего реагента TransAct и вектора CTL019 технической степени чистоты при высевании. Первичные считываемые показатели представляли собой жизнеспособность, выход жизнеспособных клеток после размножения, состав субпопуляций лейкоцитов и Т-клеток и эффективность трансдукции (определенную с помощью поверхностного иммунофенотипирования) у свежесобранных продуктов на основе CART.

Способы

Получение лентивируса и определение титра. Лентивирусный вектор, кодирующий CTL019, получали с использованием титра, определенного с помощью qPCR с использованием HEK293T, составляющего 4,7×107 т. е./мл, и приблизительного титра, определенного с использованием Т-клеток, составляющего 1,88×107 т. е./мл.

Выделение Т-клеток. Криоконсервированную лейкоцитарную массу (LKPK), полученную из продукта афереза от здорового донора, получали от HemaCare и хранили в жидком азоте до тех пор, пока она не понадобится. В день 0 образцы, полученные путем афереза, размораживали до тех пор, пока не оставались маленькие кристаллы льда, и затем разбавляли с помощью буфера для обработки Prodigy®. Автоматизированный положительный по CD4/CD8 отбор затем осуществляли с помощью программного обеспечения CliniMACS® Prodigy®, версии 1.0, с набором трубок TS 520 и трансдукцией Т-клеток (TCT). Конечный продукт, полученный с помощью Prodigy®, элюировали в полную среду для Т-клеток OpTmizer™, и концентрацию и жизнеспособность клеток определяли путем окрашивания AO/PI согласно подсчетам с помощью Cellometer Vision (Nexcelom).

Начало культивирования и трансдукция. Клетки из продукта, полученного с помощью Prodigy®, незамедлительно высевали в общей сложности в семь сосудов: пять сосудов для трансдуцированных культур и два сосуда для нетрансдуцированных (UTD) культур. В нулевой момент времени каждый сосуд засевали при плотности, составляющей $0,6\times10^6$ жизнеспособных клеток на $см^2$ мембраны, с добавлением TransAct со степенью чистоты, соответствующей GMP, и доводили до конечной концентрации, составляющей

$1,2\times10^6$ жизнеспособных клеток/мл, с помощью полной среды для Т-клеток OpTmizer™, содержащей IL-2. Вектор размораживали при комнатной температуре и добавляли в каждую трансдуцированную культуру при MOI, составляющей 0,45, исходя из приблизительного титра в Т-клетках. Вирус не добавляли в UTD контроли. После высевания культуры инкубировали при 37°C и 5% CO_2 до готовности к сбору.

Сбор. В каждый момент времени в промежутке 12-24 часа после начала культивирования одну трансдуцированную культуру отбирали для сбора. Клетки собирали посредством взбалтывания сосуда для аккуратного ресуспендирования клеток с мембраны, затем весь объем культуры ресуспендировали и переносили с помощью серологической пипетки в коническую пробирку. Небольшую аликвоту брали для подсчета перед промыванием, определения жизнеспособности и окрашивания для проточной цитометрии. Остальную часть каждой культуры промывали дважды в 50 мл (дважды в 100 мл для сосудов с UTD), ресуспендировали, и отбирали аликвоту после промывания для исследования значений числа и жизнеспособности.

Проточная цитометрия для определения состава лейкоцитов и экспрессии CD19-CAR в ходе изготовления CART. Внутрипроизводственные образцы до и после культивирования окрашивали для определения состава лейкоцитов, фенотипа Т-клеток и экспрессии CAR, когда это применимо. Экспрессию CTL019-CAR в трансдуцированных Т-клетках оценивали с использованием изготовленного по специальному заказу меченного флуорофором антиидиотипического антитела (eBioscience). В каждый момент времени сбора аликвоты культуры незамедлительно окрашивали с помощью красителя для определения жизнеспособности (Biolegend), промывали, затем окрашивали с помощью двух панелей для проточной цитометрии, обе из которых содержали краситель для CD3 и антиидиотипическое антитело, и фиксировали в параформальдегиде для сбора данных. Образцы измеряли на проточном цитометре (BD LSRFortessa; применялись одноцветные контроли для компенсации), и данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Для анализа все образцы, окрашенные для определения состава лейкоцитов, предварительно гейтировали по жизнеспособным синглетным CD45+ объектам, и все образцы, окрашенные для определения субпопуляций Т-клеток, предварительно гейтировали по жизнеспособным синглетным CD3+ объектам. Гейты по CD45RO и CCR7 получали с применением контролей флуоресценции с комбинацией детектируемых меток без одной (FMO).

Результаты

Характеристики состава лейкоцитов в LKPK, продукте, полученном с помощью Prodigy®, перед культивированием и продуктах на основе CART после культивирования определяли с помощью проточной цитометрии в день 0 и в каждый момент времени сбора. Идентифицированные типы клеток представляли собой Т-клетки (CD3+), моноциты (CD14+), В-клетки (CD19+), естественные клетки-киллеры (NK) (CD3-56+) и другие клетки (таблица 22). В результате обогащения с помощью Prodigy® получали исходный материал дня 0, который имел высокую жизнеспособность (92,9%) и был

обогащен Т-клетками (от 48% до 92%), характеризуясь при этом сниженной контаминацией В-клетками (6%-0,10%), а также моноцитами и NK-клетками до менее чем 4% каждого типа. После 12-24 часов в культуре чистота жизнеспособных клеток увеличивалась на дополнительные 3-4,4% в соответствии с незамедлительным снижением количества моноцитов и В-клеток через 12 часов и постепенным снижением количества NK-клеток в промежутке 12-24 часа. Из лейкоцитов, которые экспрессируют внеклеточный CAR, определенный с помощью проточной цитометрии, менее 3% представляли собой контаминантные клетки (т. е. не Т-клетки), при этом наибольший скачок чистоты CAR (96,6%-99,2%) происходил в промежутке 15-18 часов после высевания.

Таблица 22. Макросостав лейкоцитов в продуктах на основе CART

		% в популяции				
Момент времени	Продукт или субпопуляция	CD3+	CD14+	CD19+	CD3-CD56+	Другие
День 0	LKPK	48%	29%	6,0%	11,6%	5,0%
	Продукт, полученный с помощью Prodigy®	92%	3%	0,10%	3,7%	0,4%
CART перед замораживанием	12 ч.	95,3%	0,2%	0,02%	3,3%	1,1%
	15 ч.	95,6%	0,2%	0,01%	3,3%	0,9%
	18 ч.	96,4%	0,1%	0,0%	2,7%	0,9%
	21 ч.	96,3%	0,2%	0,0%	2,3%	1,2%
	24 ч.	96,2%	0,2%	0,0%	2,2%	1,5%
	24 ч. UTD (n=2)	96,4%	0,1%	0,06%	2,4%	1,1%
	12 ч. (только среди CAR+)	97,1%	0,6%	0,0%	2,4%	0,0%
	15 ч. (только среди CAR+)	96,6%	0,9%	0,0%	2,5%	0,0%
	18 ч. (только среди CAR+)	99,2%	0,1%	0,0%	0,7%	0,0%
	21 ч. (только среди CAR+)	99,1%	0,3%	0,0%	0,7%	0,0%
	24 ч. (только среди CAR+)	98,9%	0,3%	0,0%	0,8%	0,0%

Увеличение чистоты клеток, экспрессирующих CAR, через 18 часов в культуре (таблица 22) совпадает с увеличением процентной доли Т-клеток с поверхностной экспрессией CAR (фиг. 23A и 23C). Как наблюдалось ранее с продуктами на основе CAR-Т-клеток, полученными посредством способа быстрого изготовления, оцениваемыми с

помощью проточной цитометрии через 24 часа в культуре (см. пример 5), поверхностная экспрессия CAR не приводила к появлению отчетливо различающихся положительных и отрицательных популяций. Следовательно, гейтирование по положительной экспрессии CAR было установлено с использованием UTD образцов в качестве нижней границы. Доля CD3+ клеток, экспрессирующих внеклеточный CAR, оставалась на уровне ниже 1% к 15 часам после высевания; и затем CAR экспрессия увеличивалась на 3-4% каждые три часа, достигая максимума в 11,8% без насыщения (фиг. 23A). Интенсивность экспрессии CAR, определенная посредством MFI, также немного увеличивалась через > 18 часов в культуре, но оставалась слабой в течение до 24 часов (фиг. 23B).

Субпопуляции Т-клеток (соотношение CD4:CD8 и состав субпопуляций клеток памяти) также оценивались в каждый момент времени (фиг. 24A и 24B) с использованием комбинации CD4, CD8, CD45RO и CCR7; где недифференцированные подобные необученным Т-клетки были определены как CCR7+ CD45RO-, центральные клетки памяти как CCR7+ CD45RO+, эффекторные клетки памяти как CCR7- CD45RO+, а высокодифференцированные эффекторные Т-клетки как CCR7- CD45RO-. Во все моменты времени, в которые проводилось оценивание, культуры, в том числе UTD, содержали большую долю необученных клеток (40-47%) и меньшую долю центральных Т-клеток памяти (33-39%), по сравнению с первоначальным исходным материалом (23% и 52% соответственно). Интересно, что, хотя частота встречаемости необученных Т-клеток или центральных Т-клеток памяти в смешанной композиции не изменялась в промежутке 12-24 часа, более поздние сборы коррелировали с более высокой частотой клеток, экспрессирующих внеклеточный CAR, которые представляли собой необученные клетки, и более низкой частотой клеток, экспрессирующих внеклеточный CAR, которые представляли собой центральные клетки памяти (16% необученных клеток/63% центральных клеток памяти среди клеток, экспрессирующих CAR, через 18 часов в сравнении с 24% необученных клеток/54% центральных клеток памяти среди клеток, экспрессирующих CAR, через 24 часа). Аналогичным образом, хотя соотношение CD4:CD8 в смешанной популяции значительно не изменилось, CD4-фракция CAR+ клеток уменьшилась на 10% (с 66% до 56%) в промежутке 18-24 часа. При преобразовании этих значений частоты встречаемости в значения общего количества клеток (фиг. 25) было выявлено, что субпопуляции Т-клеток, которые, по-видимому, раньше всех экспрессируют CAR, представляют собой главным образом необученные CD4 клетки в промежутке 15-18 часов в культуре; затем быстро увеличивается частота встречаемости необученных CD8 клеток с CAR и центральных CD8 клеток памяти с CAR.

Выход (или кратность размножения) жизнеспособных клеток, равно как и жизнеспособность до и после промывания, определяли в каждый момент времени сбора (фиг. 26 и 27). Выход жизнеспособных клеток уменьшался на 13% к 18 часам после высевания (наиболее низкое значение, составлявшее 46%, совпадало с увеличением скорости экспрессии внеклеточного CAR), затем немного увеличивался до 52% для культур, собранных в более поздние моменты времени (фиг. 26). Жизнеспособность в

продукте увеличивалась после промывания до 71-77% с уменьшением жизнеспособности при сборе в промежутке 15-24 часа (фиг. 27).

Вывод

В моменты времени, тестируемые в промежутке 12-24 часа, CART, полученные посредством способа быстрого изготовления, высеянные одновременно с TransAct и вектором CTL019 технической степени чистоты, демонстрируют наивысшую поверхностную экспрессию CAR через 24 часа. Очень немногие клетки являются CAR+ (что измерено во время сбора) к 15 часам после высевания, после чего % CAR увеличивается быстрее. Интенсивность экспрессии CAR является слабой, но медленно увеличивается через 18 часов после высевания.

Продукты на основе CART, полученные посредством способа быстрого изготовления, становятся чище (больший % Т-клеток), чем исходный материал, во все моменты в промежутке 12-24 часа после высевания вследствие потери моноцитов в первые 12 часов с последующей незначительной потерей NK-клеток и любых остаточных В-клеток, не удаленных при обогащении с помощью Prodigy®.

Хотя общий выход клеток является наиболее низким при сборе через 18 часов после высевания (при незначительном улучшении через 24 часа), общий состав Т-клеток не изменяется в промежутке 12-24 часа после высевания. Т-клетки, которые первыми экспрессируют внеклеточный CAR, представляют собой главным образом центральные CD4 клетки памяти в промежутке 15-18 часов после высевания, затем необученные CD8 клетки и центральные CD8 клетки памяти демонстрируют экспрессию CAR.

Пример 7. Описание способа быстрого изготовления с активацией (ARM)

В некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетки изготавливают с использованием непрерывного способа быстрого изготовления с активацией (ARM) в течение примерно 2 дней, что будет потенциально позволять получить большее количество менее дифференцированных Т-клеток (необученных Т-клеток и T_{SCM}-клеток (стволовых центральных Т-клеток памяти)), подлежащих возвращению пациенту для размножения клеток in vivo. Короткий период времени изготовления позволяет Т-клеткам с профилем ранней дифференцировки пролиферировать в организме до их требуемого конечного дифференцированного состояния, а не в сосуде для культивирования ex vivo.

В некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетки изготавливают с использованием криоконсервированного исходного материала, полученного путем лейкафереза, например, материала немобилизованной аутологичной периферической крови, полученного путем лейкафереза (LKPK). Криоконсервированный исходный материал подвергают стадиям обработки для обогащения Т-клетками в первый день получения (день 0) с помощью иммуномагнитной системы, содержащей антитела к CD4/CD8. Положительную фракцию затем высевают в сосуд для культивирования GRex, активируют с помощью системы, содержащей антитела к CD3/CD28 (TransAct), и в тот же день трансдуцируют с помощью лентивирусного вектора (LV), кодирующего CAR. На следующий день, спустя 20-28 часов трансдукции, Т-клетки собирают, промывают четыре

раза, составляют в среде для заморозки и затем замораживают с помощью программируемого криозамораживателя (CRF). От начала способа в день 0 до начала сбора на следующий день клетки культивируют в течение 20-28 часов с целевым периодом культивирования, составляющим 24 часа после высевания в день 0.

Среды для дня 0 получали в соответствии с таблицей 21. Криоконсервированный материал, полученный путем лейкафереза, размораживают. Размороженные клетки разбавляют с помощью буфера для способа быстрого изготовления (таблица 21) и промывают на устройстве CliniMACS® Prodigy®. Т-клетки отбирают с помощью микрогранул CliniMACS® с антителами к CD4 и CD8. После завершения программы отбора Т-клеток (примерно от 3 ч. 40 мин. до 4 ч. 40 мин.) мешок для повторного применения, содержащий клетки, суспендированные в среде для способа быстрого изготовления (таблица 21), переносят в пакет для переноса. Отбирают образец для оценки жизнеспособности и числа клеток. Данные о числе и жизнеспособности клеток из положительной фракции в мешке используют для определения концентрации клеток при высевании в сосуд для культивирования для активации и трансдукции вектором.

После положительного отбора Т-клеток с помощью микрогранул CliniMACS® (с антителами к CD4 и CD8) клетки высевают в сосуд для культивирования G-Rex. После высевания клеток затем добавляют активирующий реагент (TransAct) в сосуд для культивирования. Клетки затем трансдуцируют с помощью лентивирусного вектора, кодирующего CAR, при целевой MOI, составляющей 1,0 (0,8-1,2). После добавления вектора сосуд для культивирования транспортируют в инкубатор, где его инкубируют в течение целевого времени, составляющего 24 часа (рабочий диапазон 20-28 часов), при номинальной температуре 37°C (рабочий диапазон 36-38°C) при номинальных 5% CO_2 (рабочий диапазон 4,5-5,5%). После инкубирования клетки промывают с помощью раствора для промывания собранного материала (таблица 21) четыре раза для удаления любого неинтегрировавшегося вектора и остаточных вирусных частиц, а также любых других примесей, связанных со способом. Затем клетки элюируют, и отбирают образец для тестирования для подсчета числа и жизнеспособности клеток, и результаты используют для определения объема, требуемого для ресуспендирования клеток, для конечного составления с помощью CryoStor® CS10. Клетки затем центрифугируют с удалением раствора для промывания собранного материала, и приступают к их криоконсервации.

В некоторых вариантах осуществления CAR, экспрессируемый в CAR-T-клетках, связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления IL-2, применяемый в средах для способа быстрого изготовления (RM) (таблица 21), может быть заменен на IL-15, hetIL-15 (IL-15/sIL-15Ra), IL-6 или IL-6/sIL-6Ra.

В некоторых вариантах осуществления CAR, экспрессируемый в CAR-T-клетках, связывается с BCMA. В некоторых вариантах осуществления IL-2, применяемый в средах для способа быстрого изготовления (RM) (таблица 21), может быть заменен на IL-15, hetIL-15 (IL-15/sIL-15Ra), IL-6 или IL-6/sIL-6Ra.

Пример 8. Определение характеристик CD19-CAR-Т-клеток, изготовленных с применением способа быстрого изготовления с активацией (ARM)

В данном документе раскрыт продукт на основе Т-клеток с CAR для CD19, изготовленных с применением способа быстрого изготовления с активацией (ARM). Способ ARM позволяет снизить время цикла по сравнению с способами традиционного изготовления (TM), запланированно обеспечивая своевременную инфузию продукта на основе Т-клеток с CAR для CD19 пациентам. Более того, способ ARM также позволяет сохранять предположительные стволовые Т-клетки памяти (стволовые Т-клетки) - клеточную субпопуляцию, ассоциированную с улучшенной противоопухолевой эффективностью. Основное отличие в изготовлении заключается в том, что, хотя способ TM включает фазу размножения, в которой Т-клетки с CAR для CD19 культивируют in vitro в течение 9 дней с интерлейкином (IL-) 2 перед составлением, способ ARM обеспечивает составление всего лишь после 24 часов культивирования. Это становится возможным благодаря применению полностью биосовместимой наноматрицы, связанной с моноклональными антителами (mAb) с агонистической активностью в отношении CD3 и CD28, которая отличается от парамагнитных гранул, содержащих антитела к CD3/CD28, применяемых в способе TM, тем, что может быть отмыта с остаточным лентивирусным вектором сразу после трансдукции. Результаты из ксенотрансплантатной мышиной модели, а также обогащение конечного продукта стволовыми Т-клетками - субпопуляцией, ассоциированной с увеличенной персистенцией и долгосрочными противоопухолевыми эффектами - позволяют предположить общий улучшенный терапевтический потенциал Т-клеток с CAR для CD19, изготовленных с применением способа ARM, по сравнению с Т-клетками с CAR для CD19, изготовленными с применением способа TM. Другое важное отличие, выявленное с помощью ксенотрансплантатной мышиной модели, представляет собой потенциально замедленную клеточную кинетику размножения Т-клеток с CAR для CD19, изготовленных с применением способа ARM, в течение примерно одной недели по сравнению с аналогами, изготовленными с применением способа TM. По оценкам данное замедление составляет примерно 1 неделю, что предполагает соответствующее продление окна для тщательного мониторинга потенциальных токсических эффектов от 3 недель, как в случае с Т-клетками с CAR для CD19, изготовленными с применением способа TM, до 4 недель. В отличие от этого, неклинические данные безопасности из модели высвобождения цитокинов in vitro указывают на то, что Т-клетки с CAR для CD19, изготовленные с применением способа ARM, и те, которые изготовлены с применением способа TM, могут характеризоваться сходным потенциалом индукции продуцирования IL-6 in vivo и, следовательно, нести в себе сходный риск появления синдрома высвобождения цитокинов (CRS). На основании этих данных Т-клетки с CAR для CD19, изготовленные с применением способа ARM, будут изучаться в открытом клиническом исследовании фазы I у пациентов с мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (SLL)/хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) на поздней стадии в комбинации с ингибитором тирозинкиназы Брутона

(BTKi) ибрутинибом (Imbruvica) - уже одобренным лекарственным средством при данном показании и в качестве средства монотерапии при DLBCL.

Получение и анализ in vitro

Для тестирования способа ARM в отношении изготовления Т-клеток с CAR для CD19 в клиническом масштабе замороженный продукт лейкафереза от здорового донора (лейкоцитарную массу, LKPK) использовали в качестве исходного материала, описанного на фиг. 28A в качестве иллюстративного примера. LKPK содержал 37% Т-клеток, 4% NK-клеток, 37% моноцитов и 15% В-клеток (фиг. 28A). После размораживания Т-клетки подвергали положительному отбору с помощью микрогранул с антителами к CD4 и CD8. Состав продукта после положительного отбора в отношении Т-клеток представлял собой 95,4% Т-клеток, 1,9% NK-клеток, 1,7% моноцитов и 0,1% В-клеток (фиг. 28A).

Подвергнутые положительному отбору Т-клетки активировали с помощью полимерной наноматрицы, конъюгированной с агонистическими моноклональными антителами к CD3 и CD28, и трансдуцировали с помощью лентивирусного вектора, кодирующего CAR для CD19. После 24 часов в культуре клетки собирали и криоконсервировали (такие клетки называются в данном примере "ARM-CAR для CD19"). Параллельно с этим CAR-Т-клетки получали с применением способа традиционного изготовления (TM) (такие клетки называются в данном примере "TM-CAR для CD19") с использованием Т-клеток от того же донора и лентивирусного вектора. В способе TM использовались парамагнитные гранулы, связанные с антителами к CD3 и CD28, и 9-дневный период культивирования в колбах для тканевых культур с последующими такими же процедурами сбора и замораживания. CAR-Т-клетки, полученные посредством каждого способа, анализировали с помощью проточной цитометрии для оценивания экспрессии CAR после размораживания, а также фенотипа Т-клеток (фиг. 28B-28D). Анализ фенотипа Т-клеток выявил, что способ ARM обеспечивал сохранение Т-клеток, подобных необученным (45,1% CD45RO-/CCR7+), в обоих из компартментов CD8 и CD4, при этом способ TM приводил к получению главным образом центральных Т-клеток памяти (T_{CM}) (68,6% CD45RO+/CCR7+ по сравнению с 43,6% для ARM-CAR для CD19) (фиг. 28C и 28D). Важно отметить, что способ ARM обеспечивал лучшее поддержание исходной популяции CD45RO-/CCR7+ Т-клеток, подобных необученным, по сравнению со способом TM, также проводимым в CAR+ популяции (28,6% в исходном материале, 37,5% для ARM-CAR для CD19 и 4,5% для TM-CAR для CD19) (фиг. 28C и 28D). Данная популяция Т-клеток в значительной степени перекрывается с CD45RO-/CD27+ стволовыми Т-клетками, описанными Fraietta, et al (2018) Nat Med, 24(5); 563-571, и ассоциированными со стойкой ремиссией CLL в клиническом испытании фазы I.

В дополнение к его фенотипу, конечный продукт на основе клеток с ARM-CAR для CD19 также оценивали в отношении его функции in vitro. ARM-CAR для CD19 и TM-CAR для CD19 размораживали и совместно культивировали с линиями клеток NALM6 (ALL) или TMD-8 (DLBCL), экспрессирующими CD19. Сравнение уровней цитокинов в надосадочных жидкостях через 48 часов после совместного культивирования выявило 11-

17-кратное увеличение уровня IFN-γ и 3,5-10-кратное увеличение уровней IL-2, секретируемых ARM-CAR для CD19, по сравнению с TM-CAR для CD19 в зависимости от стимулирующих раковых клеток (NALM6 или TMD-8, фиг. 29A и 29C). Эксперименты с нетрансдуцированными (UTD) клетками, подвергнутыми способу ARM или TM (фиг. 29C), или с CD19-отрицательными клетками-мишенями NALM6 (NALM6-19KO) (фиг. 29D) подтверждали CD19-специфичное распознавание с помощью ARM-CAR для CD19 и TM-CAR для CD19. Более высокая фоновая секреция IFN-γ ARM-UTD и ARM-CAR для CD19 при отсутствии CD19-специфичной стимуляции (фиг. 29A и 29B соответственно), вероятно, обусловлена активированной природой таких продуктов. Данная фоновая секреция уменьшалась через 48 часов совместного культивирования (фиг. 29B и 29D). Промежуточное промывание клеток после первых 24 часов совместного культивирования с клетками-мишенями с последующим совместным культивированием в течение дополнительных 24 часов (24 ч. + 24 ч.) дополнительно усиливало различие между фоновой и CD19-специфичной секрецией цитокинов. Данное условие 24 ч. + 24 ч. подчеркивает то, что фоновая секреция IFN-γ ARM-CAR для CD19 ослабляется после первых 24 часов.

Таким образом, способ ARM, применяемый для получения ARM-CAR для CD19, приводит к получению Т-клеток со сходной или более высокой экспрессией CAR по сравнению с TM-CAR для CD19. Важно отметить, что способ ARM обеспечивает сохранение фенотипа Т-клеток, сходного с исходным материалом. ARM-CAR для CD19 демонстрирует CD19-специфичную активацию in vitro и секретирует IL-2 на более высоких уровнях по сравнению с TM-CAR для CD19, что коррелирует с его фенотипом стволовых Т-клеток.

Эффективность in vivo

Исследования эффективности in vivo применяли для определения направления разработки способа ARM, что в конечном итоге приводит к получению способа, который будет применяться для клинического изготовления Т-клеток с CAR для CD19. Для описанного в данном документе эксперимента ARM-CAR для CD19 получали в клиническом масштабе. Параллельно с этим получали TM-CAR для CD19 с использованием того же лентивирусного вектора и Т-клеток от того же донора. Эффективность CAR-Т-клеток, полученных с применением разных способов, оценивали у мышей NSG с иммунодефицитом (NOD-scid IL2Rg-нулевых), которым инокулировали линию клеток пре-В-клеточного ALL NALM6. Данная линия опухолевых клеток приживляется в костном мозге, но в случае высокой опухолевой нагрузки она может также выявляться в кровотоке. Через семь дней после инокуляции линии лейкозных клеток мыши в когортах получали однократную инфузию CAR+ Т-клеток (фиг. 30A). Запланированные дозы, составляющие $0{,}2\times10^6$, $0{,}5\times10^6$ и 2×10^6 жизнеспособных CAR+ Т-клеток, определяли на основании анализа TM-CAR для CD19 и ARM-CAR для CD19 методом проточной цитометрии после размораживания в день 0.

Ввиду проблемы псевдотрансдукции для ARM-CAR для CD19 в день 0 после

размораживания содержимое сигнального флакона размораживали и культивировали в течение вплоть до 5 дней, и экспрессию CAR (процентную долю и среднюю интенсивность флуоресценции) анализировали с помощью проточной цитометрии в различные моменты времени (фиг. 30B). Процентная доля положительных клеток в более поздние моменты времени была ниже по сравнению с образцом после размораживания в день 0. В то же время средняя интенсивность флуоресценции CAR в расчете на клетку была выше, что отражает наличие стабильно трансдуцированных CAR-T-клеток. Измерение в день 3 использовали для определения фактической дозы ARM-CAR для CD19, которая составляла $0,1\times10^6$, $0,25\times10^6$ и 1×10^6 жизнеспособных CAR+ T-клеток. Доза TM-CAR для CD19 оставалась неизменной ($0,2\times10^6$, $0,5\times10^6$ и 2×10^6 жизнеспособных CAR+ T-клеток), поскольку анализ методом проточной цитометрии образцов после размораживания проводили на покоящихся CAR-T-клетках с полной интеграцией.

Как ARM-CAR для CD19, так и TM-CAR для CD19 индуцировали регрессию опухоли дозозависимым образом (фиг. 30C). У мышей, обработанных с помощью $0,5\times10^6$ или 2×10^6 клеток TM-CAR для CD19 или $0,25\times10^6$ или 1×10^6 клеток ARM-CAR для CD19, наблюдалась устойчивая регрессия опухоли. Интересно, что при соответствующей наиболее низкой тестируемой дозе ($0,2\times10^6$ клеток TM-CAR для CD19 или $0,1\times10^6$ клеток ARM-CAR для CD19) ответ на TM-CAR для CD19 не был стойким, и у всех мышей в конечном итоге наблюдался рецидив после первоначального частичного контроля лейкоза. В отличие от этого, у мышей, обработанных наиболее низкой дозой ($0,1\times10^6$) ARM-CAR для CD19, демонстрировалось устойчивое снижение опухолевой нагрузки, которое продолжалось до конца исследования. Кинетика регрессии опухоли свидетельствует о замедленной на приблизительно 1 неделю активации ARM-CAR для CD19, что позволяет предположить, что стволовым T-клеткам необходимо пройти пролиферацию и дифференцировку в эффекторные клетки для проявления их противоопухолевой активности.

У мышей, обработанных с помощью CAR-T-клеток и UTD клеток, полученных посредством двух способов изготовления, отбирали кровь дважды в неделю для измерения уровней цитокинов (фиг. 31A-31D). Уровни циркулирующего IFN-γ у мышей, получавших инфузию CAR-T-клеток - ARM-CAR для CD19 либо TM-CAR для CD19 - демонстрировали двухфазный паттерн (фиг. 31A). Ранний пик IFN-γ наблюдался в дни 4-7 после инфузии CAR-T-клеток, и он, вероятно, связан с CD19-специфичной активацией после распознавания опухоли, поскольку он не наблюдался у мышей, получавших инфузию TM-UTD или ARM-UTD (фиг. 31B). Ранняя CD19-опосредованная активация подтверждалась сопутствующим повышением уровней IL-2 in vivo (фиг. 31C), которое, однако, ослаблялось в более поздние моменты времени.

Клеточная кинетика in vivo

В качестве части фармакологического исследования для оценивания эффективности ARM-CAR для CD19 у мышей NSG размножение CAR+ T-клеток

оценивали in vivo (фиг. 32). Концентрацию CD3+/CAR+ Т-клеток в крови анализировали с помощью проточной цитометрии в течение вплоть до 4 недель после инфузии. Может быть сделано заключение о размножении CAR-Т-клеток. Однако долгосрочная персистенция не может быть оценена ввиду ограниченного времени исследования, обусловленного появлением X-GVHD. Размножение клеток наблюдалось как для ARM-CAR для CD19, так и для TM-CAR для CD19 во всех дозах, за исключением TM-CAR для CD19 при наиболее низкой дозе, составляющей $0,2\times10^6$ клеток. Воздействие (Cmax и AUC в течение 21 дня после инъекции клеток) увеличивалось с увеличением дозы как TM-CAR для CD19, так и ARM-CAR для CD19. Для сравнения размножения ARM-CAR для CD19 с TM-CAR для CD19 при одном и том же уровне дозы воздействие TM-CAR для CD19 интерполировали на сравнимые дозы ARM-CAR для CD19 ($0,25\times10^6$ и 1×10^6 клеток). Cmax была в 24-46 раз выше, и AUC0-21d была в 18-33 раза выше по сравнению с TM-CAR для CD19 при дозах, составляющих $0,25\times10^6$ и 1×10^6 клеток. Время достижения пикового размножения ARM-CAR для CD19 (Tmax) было замедлено на по меньшей мере 1 неделю по сравнению с TM-CAR для CD19.

Таким образом, фармакологические исследования для оценивания ARM-CAR для CD19 in vitro продемонстрировали, что ARM-CAR для CD19 характеризуется фенотипом ранней дифференцировки и характеризуется потенциалом секреции большего количества IFN-γ и IL-2. ARM-CAR для CD19 демонстрировал замедленное, но более значительное размножение клеток in vivo, индуцировал секрецию большего количества IL-2 и контролировал рост опухоли при более низких дозах по сравнению с TM-CAR для CD19. Обсуждаются другие признаки ARM-CAR для CD19, такие как повышенные уровни IFN-γ в плазме крови в более поздние моменты времени и более раннее появление X-GVHD. наблюдаемое как для ARM-CAR для CD19, так и для ARM-UTD, что подчеркивает ограничения используемой в данном документе ксенотрансплантатной мышиной модели. В совокупности эти результаты подтверждают гипотезу о том, что ARM-CAR для CD19 содержит Т-клетки с более выраженными признаками стволовости, что позволяет ARM-CAR для CD19 эффективно приживляться, размножаться и отторгать опухоли.

Анализ высвобождения IL-6 in vitro

Модель трехкомпонентной совместной культуры для изучения потенциала индукции IL-6 CAR-Т-клетками in vitro была впервые опубликована Norelli, et al (2018) Nat Med., Jun;24(6); 739-748 и используется в данном документе с некоторыми адаптациями. Данная модель состоит из CAR-Т-клеток, лейкозных клеток-мишеней и моноцитарных клеток-"свидетелей" THP-1 в качестве источника миелоидных клеток для увеличенного до максимума продуцирования IL-6. В этой клеточной модели in vitro секреция IL-6 ARM-CAR для CD19 либо TM-CAR для CD19 в отдельности увеличивалась посредством совместного культивирования с клетками-мишенями, экспрессирующими CD19, и клетками THP-1 (фиг. 33A и 33B). Важно отметить, что зависимая от времени CD19-специфичная секреция IL-6, индуцированная ARM-CAR для CD19, совпадала с секрецией, индуцированной TM-CAR для CD19. В той же самой модели in vitro CD19-

специфичная секреция IFN-γ в условии с ARM-CAR для CD19 была в 10 раз выше, чем в условии с TM-CAR для CD19 (данные не показаны).

Сводка результатов

Эти результаты позволяют предположить, что ARM-CAR для CD19 может характеризоваться более сильным противоопухолевым потенциалом и сходным профилем безопасности по сравнению с TM-CAR для CD19. Заключение о более сильном противоопухолевом потенциале делается на основании лучшего контроля опухоли при наиболее низкой тестируемой дозе и более значительного размножения клеток in vivo. При таком расчете может, однако, недооцениваться общий терапевтический потенциал ARM-CAR для CD19, поскольку его анализировали в модели ALL (NALM6), которая является более агрессивной, чем два показания при заболеваниях (CLL и DLBCL), при которых ARM-CAR для CD19 будет изначально изучаться. При CLL, в частности, где размножение CAR-T-клеток in vivo устойчиво коррелирует с регрессией опухоли (Mueller, et al (2017) Blood. 130(21); 2317-2325; Fraietta, et al (2018) Nat Med, 24(5); 563-571), значительно более высокий потенциал пролиферации ARM-CAR для CD19 (вплоть до 20-кратного) может приводить к значимой превосходящей эффективности по сравнению с TM-CAR для CD19.

У мышей раннее системное высвобождение IFN-γ и IL-2 ARM-CAR для CD19, ассоциированное с CAR-опосредованной регрессией опухоли, было в 3 раза и в 10 раз выше, чем при индукции CAR-T-клетками, изготовленными с применением традиционного способа, соответственно. Уровни IL-6 не изучались in vivo, поскольку недостаток функциональных миелоидных клеток у данной линии приводит к неспособности продуцировать воспалительные цитокины (Norelli, et al (2018) Nat Med., Jun;24(6); 739-748; Giavridis, et al (2018) Nat Med., Jun;24(6);731-738). Чтобы избежать этого и оценить потенциал высвобождения IL-6, индуцированного ARM-CAR для CD19, in vivo, использовали систему трехкомпонентной совместной культуры in vitro, в которой моноцитарные клетки-"свидетели" добавляли в качестве источника воспалительных цитокинов (Norelli, et al (2018) Nat Med., Jun;24(6); 739-748). В данной системе продуцирование IL-6 было сходным между ARM-CAR для CD19 и CAR-T-клетками, изготовленными с применением традиционного способа, что позволяет предположить сходный риск возникновения CRS. В отличие от этого, ввиду замедленной кинетики размножения клеток ARM-CAR для CD19 будет необходимо продление периода мониторинга CRS от 3 недель, типичных для TM-CAR для CD19, до 4 недель. Эксперименты in vitro с ARM-CAR для CD19 также выявили потенциал транзиентной не опосредованной CAR секреции IFN-γ и IL-2 ARM-CAR для CD19 в течение первых 3 дней культивирования после размораживания. Комплексная оценка риска на основе данных от пациентов, получавших рекомбинантный IL-2 человека (Proleukin) и рекомбинантный IFN-γ человека (ACTIMMUNE), и рассмотрение прогнозируемых уровней воздействия после инфузии ARM-CAR для CD19 указывает на то, что риск системных симптомов (лихорадка, озноб, эритема), описанных у этих пациентов, будет очень низким. Для

дополнительного смягчения данного риска пациенты, получавшие ARM-CAR для CD19, будут госпитализированы на по меньшей мере 72 часа после инфузии клеточного продукта.

Наконец, в токсикологическом исследовании, не соответствующем GLP, у мышей NSG, которым приживляли ARM-CAR для CD19, не демонстрировалось неожиданное поведение по сравнению с CAR-T-клетками, изготовленными с применением традиционного способа, и нетрансдуцированными клетки, подвергнутыми способу ARM, при оценке крови или органов лимфатической системы путем иммунофенотипирования, а также гистологическом оценивании соответствующего набора органов.

Пример 9. CAR-T-клетки для BCMA, изготовленные с применением способа ARM

Способы

Выделение Т-клеток

Свежую лейкоцитарную массу, полученную из продуктов афереза от здоровых доноров, получали от HemaCare и хранили в паровой фазе жидкого азота (LN2) до тех пор, пока она не понадобится. В день 0 две четверти лейкоцитарной массы удаляли из LN2, нагревали в Plasmatherm (Barkey, Леопольдсхеэ, Германия) до тех пор, пока не оставались маленькие кристаллы льда, и разбавляли с помощью буфера для обработки Prodigy®. Автоматизированный положительный по CD4/CD8 отбор затем осуществляли с помощью программного обеспечения CliniMACS® Prodigy®, версии 1.0, с набором трубок TS 520 и трансдукцией Т-клеток (TCT). Число и жизнеспособность клеток для каждого выходного материала Prodigy® (продукт, отходы и нецелевые клетки) определяли путем окрашивания AO/PI согласно подсчетам с помощью Cellometer Vision (Nexcelom, Лоренс, Массачусетс) для оценки общего выхода клеток и выхода Т-клеток. Обогащенный по CD4/CD8 продукт элюировали в полную среду для Т-клеток OpTmizer™ и разделяли для дополнительного культивирования с применением 24-часового либо традиционного 9-дневного способа (TM). Оставшиеся Т-клетки замораживали в резервуаре с LN. Чистоту Т-клеток оценивали с помощью анализов методом проточной цитометрии.

Получение CAR-T-клеток с применением способа ARM

Т-клетки, очищенные с помощью Prodigy®, высевали в сосуды различного масштаба, такие как планшет, колба, сосуд G-REX или CentriCult полного клинического масштаба. После высевания добавляли полимерную наноматрицу TransAct (Miltenyi Biotec), конъюгированную с агонистическими антителами к CD3 и CD28, в дополнение к лентивирусному вектору клинической степени чистоты. Клетки инкубировали в полной среде для Т-клеток OpTmizer™, содержащей 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 человека (Prometheus, Сан-Диего, Калифорния), 2% ICRS (Life Technologies), в течение 24 ч. перед сбором и криоконсервацией.

Аликвоты криоконсервированных CAR-T-клеток размораживали в предварительно нагретой полной среде OpTmizer™, промывали дважды с помощью 20х объема в предварительно нагретой среде перед культивированием и анализами методом проточной цитометрии для оценки экспрессии CAR для BCMA и признаков стволовости в различные

моменты времени после размораживания. Аликвоты клеточных продуктов совместно культивировали с линиями клеток-мишеней для оценки высвобождения цитокинов в ответ на специфичную стимуляцию антигеном.

Получение CAR-T-клеток с применением способа TM

T-клетки, обработанные с помощью Prodigy®, ресуспендировали в теплой полной среде для T-клеток RPMI и высевали в 24-луночные планшеты. T-клетки инкубировали в течение ночи при 37°C с гранулами Human T-Expander с антителами к CD3/CD28 при соотношении гранул и клеток, составляющем 3:1.

В день 1 добавляли лентивирусы при MOI, составляющей 2, исходя из титра в SUP-T1. Вирус не добавляли в нетрансдуцированный контроль (UTD). T-клетки инкубировали в течение ночи при 37°C с последующим добавлением 1 мл полной среды для T-клеток на лунку, после чего их инкубировали в течение ночи при 37°C. В течение оставшихся семи дней размножения культуры T-клетки переносили в колбы для тканевых культур и разбавляли полной средой для T-клеток каждые два дня.

В дни 8-9 от T-клеток удаляли гранулы, и их собирали и криоконсервировали в замораживающей среде CryoStor CS10, замораживали при -80°C в контейнерах для замораживания клеток CoolCell (BioCision) и переносили в LN2 на следующий день. Небольшие аликвоты T-клеток окрашивали для выявления экспрессии CAR. Одноцветные контроли были включены для компенсации. Образцы измеряли на проточном цитометре (BD LSRFortessa), и данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo.

Линия клеток-мишеней и культивирование

Клетки Nalm6 трансфицировали лентивирусной конструкцией с репортерным геном люциферазы светлячка для создания линии клеток Nalm6-luc. Клетки выращивали в инкубаторах при 37°C с 5% CO_2. Использовали аликвоту клеток для выявления экспрессии опухолевого антигена BCMA до применения.

Анализ секреции цитокинов in vitro

Секрецию цитокинов T-клетками с CAR для BCMA (называемыми эффекторными клетками) в ответ на экспрессирующие BCMA клетки-мишени оценивали путем инкубирования CAR-T-клеток с клетками-мишенями при 2,5-кратном соотношении E:T в течение 20 ч. в 96-луночных плоскодонных планшетах. Эффекторные клетки представляли собой CAR-T-клетки PI61, R1G5 и BCMA10, полученные с применением способа ARM либо способа TM. CAR-T-клетки, изготовленные с применением способа ARM, высевали для условия 24-часового отмывания, что позволяло клеткам находиться в покоящемся состоянии и минимизировать неспецифическую активность. Клетки-мишени включают BCMA-положительные KMS11-luc или BCMA-отрицательные NALM6-luc. Эти клетки-мишени добавляли к свежевысеянным T-клеткам или T-клеткам после 24-часового отмывания (только клетки, полученные с применением способа ARM). Для данного анализа % трансдукции CAR-T-клеток нормализовали путем добавления UTD к T-клеткам с CAR для BCMA. Это позволяло проводить сравнение одного и того же количества CART и одного и того же общего количества T-клеток в каждом образце. Надосадочную

жидкость из момента времени 20 часов совместного культивирования эффекторных клеток и клеток-мишеней собирали из каждой лунки и замораживали при -20°C для применения в MSD-анализе цитокинов. Использовали набор собственной разработки MSD V-PLEX для IFN-γ и IL-2 человека (№ K151A0H-4A) для количественной оценки секретируемых цитокинов в каждом из образцов надосадочной жидкости.

Результаты

Способ ARM обеспечивает сохранение стволовости Т-клеток

CAR-Т-клетки, полученные посредством способа ARM, анализировали с помощью проточной цитометрии для оценивания их экспрессии CAR при размораживании и через 48 ч. после размораживания, а также фенотипа Т-клеток (фиг. 34A, 34B и 34C). Для CAR-Т-клеток, изготовленных с применением способа TM, экспрессию CAR оценивали в день 9 перед сбором (фиг. 35A). CAR для BCMA практически не поддавался выявлению при размораживании, что показано на фиг. 34A. Однако через 48 ч. после размораживания CAR для BCMA отчетливо экспрессировался на уровне 32,9% для PI61, 35,9% для R1G5 и 17,4% для BCMA10. Клетки дня 9, полученные с применением способа TM, демонстрируют экспрессию CAR для BCMA на уровне 36% для PI61, 40% для R1G5 и 7% для BCMA10 (фиг. 35A). Анализ фенотипа CAR+ Т-клеток выявил, что способ ARM обеспечивал сохранение Т-клеток, подобных необученным (~ 60% CD45RO-/CCR7+ для PI61 и R1G5, 32% CD45RO-/CCR7+ для BCMA10) (фиг. 34C). Способ TM приводил к получению главным образом центральных Т-клеток памяти (TCM) (72 ~81% CD45RO+/CCR7+ для всех трех BCMA-CART), тогда как популяция Т-клеток, подобных необученным, практически исчезала среди CAR+ Т-клеток, изготовленных с применением способа TM (фиг. 35B). В целом, популяция необученных Т-клеток в значительной степени перекрывается с CD45RO-/CD27+ стволовыми Т-клетками, описанными в предыдущих сообщениях (Cohen AD, et al (2019). J Clin Invest. 130. pii: 126397. doi: 10.1172/JCI126397; Fraietta, JA, et al (2018). Nat Med, 24(5); 563-571), и ассоциирована с ответами и размножением CART.

В дополнение к их фенотипу, конечные продукты на основе CAR-Т-клеток PI61, R1G5 и BCMA10 также оценивали в отношении их функции in vitro. Клеточные продукты PI61, R1G5 и BCMA10 размораживали и совместно культивировали с линией клеток KMS-11, экспрессирующей BCMA, при соотношении 1:1. Клетки, полученные посредством способа ARM, после размораживания оставляли в покоящемся состоянии на 24 ч. перед формированием совместной культуры. Сравнение уровней цитокинов в надосадочных жидкостях через 24 часа после совместного культивирования выявило ~5-25-кратное увеличение уровней IL-2 и ~3-7-кратное увеличение уровней IFN-γ, секретируемых продуктами, полученными посредством способа ARM, по сравнению с продуктами, полученными посредством способа TM, как показано на фиг. 36A-36D. Эксперименты с нетрансдуцированными (UTD) клетками, подвергнутыми способу ARM или TM, подтверждали BCMA-специфичное распознавание с помощью PI61, R1G5 и BCMA10.

Таким образом, CAR-T-клетки PI61, R1G5 и BCMA10, полученные с применением способа ARM, демонстрируют BCMA-специфичную активацию in vitro и секретируют IL-2 и IFN-γ на более высоких уровнях по сравнению с продуктами, полученными посредством способа TM, что коррелирует с фенотипом столовых Т-клеток у CAR-T-клеток, полученных с применением способа ARM.

Пример 10. Анализ генных сигнатур CAR-T-клеток, изготовленных с применением способа ARM

Способы

Секвенирование РНК одиночных клеток

Библиотеки для секвенирования РНК одиночных клеток создавали с помощью устройства 10X Genomics Chromium Controller и дополнительных наборов для конструирования библиотек.

Криоконсервированные клетки размораживали, подсчитывали и сортировали с помощью проточной цитометрии (если это необходимо для исследуемого вопроса) до загрузки в устройство 10X Genomics. Отдельные клетки загружали в капли, и осуществляли штрихкодирование РНК в отдельных каплях с помощью гранулы GemCode. Штрихкодированные РНК высвобождали из капель и преобразовывали в библиотеку секвенирования полного транскриптома, совместимую с Illumina.

Созданные библиотеки секвенировали на устройстве Illumina HiSeq и анализировали с применением программного конвейера для анализа 10X Genomics и программного обеспечения Loupe Cell Browser.

Иммунологическое профилирование одиночных клеток

Созданные с помощью 10X Genomics библиотеки полного транскриптома одиночных клеток использовали в качестве опорного материала для осуществления профилирования и анализа репертуара иммунных клеток. Последовательности Т-клеточных рецепторов подвергали ПЦР-амплификации из 5'-библиотек секвенирования одиночных клеток Chromium и анализировали на устройстве для секвенирования Illumina.

Программный конвейер для анализа

Данные секвенирования РНК одиночных клеток обрабатывали с помощью программного конвейера для анализа Cell Ranger, начиная с файлов FASTQ. Подробное описание программного конвейера для анализа Cell Ranger можно найти на https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/what-is-cell-ranger. Общий программный конвейер включает выравнивание, фильтрацию, подсчет штрихкодов и подсчет UMI. Клеточные штрихкоды применяли для образования матриц на основе генов и штрихкодов, определения кластеров и осуществления анализа экспрессии генов. Данные о количественных показателях экспрессии генов нормализовали с помощью пакета Seurat Bioconductor. Клетки, которые имели менее 200 экспрессируемых генов, отбрасывали из анализа. Гены, которые экспрессировались только в 2 клетках или меньше, отбрасывали из анализа. Оставшиеся данные нормализовали с помощью способа логарифмической нормализации Seurat с использованием коэффициента пересчета,

составляющего 10000. Данные масштабировали посредством регрессии по количеству выявленных молекул на клетку. Балл набора генов (балл для набора генов) рассчитывали, используя среднее логарифмически нормализованное значение экспрессии гена для всех генов в наборе генов. Каждое значение экспрессии гена нормализуют с помощью Z-оценки так, что среднее значение экспрессии гена среди образцов составляет 0, и стандартное отклонение составляет 1. Балл набора генов затем рассчитывают как среднее значение для нормализованных значений экспрессии гена в наборе генов. Иллюстративный расчет балла набора генов описан ниже.

Для данного примера расчета балла набора генов нормализованные значения экспрессии гена в двух (2) образцах для шести (6) генов представлены в таблице 23. Для целей данного иллюстративного расчета набор генов состоит из генов 1-4. Следовательно, оба из образцов 1 и 2 имеют балл набора генов, составляющий 0.

Таблица 23. Иллюстративный набор данных для расчета балла набора генов

	Образец 1	**Образец 2**
Ген 1	-3	0
Ген 2	3	0
Ген 3	1	0
Ген 4	-1	0
Ген 5	10	4
Ген 6	-5	3

Набор генов "активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM" включает следующие гены: MXRA7, CLIC1, NAT13, TBC1D2B, GLCCI1, DUSP10, APOBEC3D, CACNB3, ANXA2P2, TPRG1, EOMES, MATK, ARHGAP10, ADAM8, MAN1A1, SLFN12L, SH2D2A, EIF2C4, CD58, MYO1F, RAB27B, ERN1, NPC1, NBEAL2, APOBEC3G, SYTL2, SLC4A4, PIK3AP1, PTGDR, MAF, PLEKHA5, ADRB2, PLXND1, GNAO1, THBS1, PPP2R2B, CYTH3, KLRF1, FLJ16686, AUTS2, PTPRM, GNLY и GFPT2.

Набор генов "активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff" включает следующие гены: C12orf75, SELPLG, SWAP70, RGS1, PRR11, SPATS2L, SPATS2L, TSHR, C14orf145, CASP8, SYT11, ACTN4, ANXA5, GLRX, HLA-DMB, PMCH, RAB11FIP1, IL32, FAM160B1, SHMT2, FRMD4B, CCR3, TNFRSF13B, NTNG2, CLDND1, BARD1, FCER1G, TYMS, ATP1B1, GJB6, FGL2, TK1, SLC2A8, CDKN2A, SKAP2, GPR55, CDCA7, S100A4, GDPD5, PMAIP1, ACOT9, CEP55, SGMS1, ADPRH, AKAP2, HDAC9, IKZF4, CARD17, VAV3, OBFC2A, ITGB1, CIITA, SETD7, HLA-DMA, CCR10, KIAA0101, SLC14A1, PTTG3P, DUSP10, FAM164A, PYHIN1, MYO1F, SLC1A4, MYBL2, PTTG1, RRM2, TP53INP1, CCR5, ST8SIA6, TOX, BFSP2, ITPRIPL1, NCAPH, HLA-DPB2, SYT4, NINJ2, FAM46C, CCR4, GBP5, C15orf53, LMCD1, MKI67, NUSAP1, PDE4A, E2F2, CD58, ARHGEF12, LOC100188949, FAS, HLA-DPB1, SELP, WEE1, HLA-DPA1, FCRL1, ICA1, CNTNAP1, OAS1, METTL7A, CCR6, HLA-DRB4, ANXA2P3, STAM, HLA-DQB2, LGALS1, ANXA2, PI16, DUSP4, LAYN, ANXA2P2, PTPLA, ANXA2P1, ZNF365, LAIR2,

LOC541471, RASGRP4, BCAS1, UTS2, MIAT, PRDM1, SEMA3G, FAM129A, HPGD, NCF4, LGALS3, CEACAM4, JAKMIP1, TIGIT, HLA-DRA, IKZF2, HLA-DRB1, FANK1, RTKN2, TRIB1, FCRL3 и FOXP3.

Набор генов "подавляемые в состоянии стволовости" включает следующие гены: ACE, BATF, CDK6, CHD2, ERCC2, HOXB4, MEOX1, SFRP1, SP7, SRF, TAL1 и XRCC5.

Набор генов "активируемые при гипоксии" включает следующие гены: ABCB1, ACAT1, ADM, ADORA2B, AK2, AK3, ALDH1A1, ALDH1A3, ALDOA, ALDOC, ANGPT2, ANGPTL4, ANXA1, ANXA2, ANXA5, ARHGAP5, ARSE, ART1, BACE2, BATF3, BCL2L1, BCL2L2, BHLHE40, BHLHE41, BIK, BIRC2, BNIP3, BNIP3L, BPI, BTG1, C11orf2, C7orf68, CA12, CA9, CALD1, CCNG2, CCT6A, CD99, CDK1, CDKN1A, CDKN1B, CITED2, CLK1, CNOT7, COL4A5, COL5A1, COL5A2, COL5A3, CP, CTSD, CXCR4, D4S234E, DDIT3, DDIT4, 1-Dec, DKC1, DR1, EDN1, EDN2, EFNA1, EGF, EGR1, EIF4A3, ELF3, ELL2, ENG, ENO1, ENO3, ENPEP, EPO, ERRFI1, ETS1, F3, FABP5, FGF3, FKBP4, FLT1, FN1, FOS, FTL, GAPDH, GBE1, GLRX, GPI, GPRC5A, HAP1, HBP1, HDAC1, HDAC9, HERC3, HERPUD1, HGF, HIF1A, HK1, HK2, HLA-DQB1, HMOX1, HMOX2, HSPA5, HSPD1, HSPH1, HYOU1, ICAM1, ID2, IFI27, IGF2, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP5, IL6, IL8, INSIG1, IRF6, ITGA5, JUN, KDR, KRT14, KRT18, KRT19, LDHA, LDHB, LEP, LGALS1, LONP1, LOX, LRP1, MAP4, MET, MIF, MMP13, MMP2, MMP7, MPI, MT1L, MTL3P, MUC1, MXI1, NDRG1, NFIL3, NFKB1, NFKB2, NOS1, NOS2, NOS2P1, NOS2P2, NOS3, NR3C1, NR4A1, NT5E, ODC1, P4HA1, P4HA2, PAICS, PDGFB, PDK3, PFKFB1, PFKFB3, PFKFB4, PFKL, PGAM1, PGF, PGK1, PGK2, PGM1, PIM1, PIM2, PKM2, PLAU, PLAUR, PLIN2, PLOD2, PNN, PNP, POLM, PPARA, PPAT, PROK1, PSMA3, PSMD9, PTGS1, PTGS2, QSOX1, RBPJ, RELA, RIOK3, RNASEL, RPL36A, RRP9, SAT1, SERPINB2, SERPINE1, SGSM2, SIAH2, SIN3A, SIRPA, SLC16A1, SLC16A2, SLC20A1, SLC2A1, SLC2A3, SLC3A2, SLC6A10P, SLC6A16, SLC6A6, SLC6A8, SORL1, SPP1, SRSF6, SSSCA1, STC2, STRA13, SYT7, TBPL1, TCEAL1, TEK, TF, TFF3, TFRC, TGFA, TGFB1, TGFB3, TGFBI, TGM2, TH, THBS1, THBS2, TIMM17A, TNFAIP3, TP53, TPBG, TPD52, TPI1, TXN, TXNIP, UMPS, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VIM, VPS11 и XRCC6.

Набор генов "активируемые при аутофагии" включает следующие гены: ABL1, ACBD5, ACIN1, ACTRT1, ADAMTS7, AKR1E2, ALKBH5, ALPK1, AMBRA1, ANXA5, ANXA7, ARSB, ASB2, ATG10, ATG12, ATG13, ATG14, ATG16L1, ATG16L2, ATG2A, ATG2B, ATG3, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG5, ATG7, ATG9A, ATG9B, ATP13A2, ATP1B1, ATPAF1-AS1, ATPIF1, BECN1, BECN1P1, BLOC1S1, BMP2KL, BNIP1, BNIP3, BOC, C11orf2, C11orf41, C12orf44, C12orf5, C14orf133, C1orf210, C5, C6orf106, C7orf59, C7orf68, C8orf59, C9orf72, CA7, CALCB, CALCOCO2, CAPS, CCDC36, CD163L1, CD93, CDC37, CDKN2A, CHAF1B, CHMP2A, CHMP2B, CHMP3, CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C, CHMP6, CHST3, CISD2, CLDN7, CLEC16A, CLN3, CLVS1, COX8A, CPA3, CRNKL1, CSPG5, CTSA, CTSB, CTSD, CXCR7, DAP, DKKL1, DNAAF2, DPF3, DRAM1, DRAM2, DYNLL1, DYNLL2, DZANK1, EI24, EIF2S1, EPG5, EPM2A, FABP1, FAM125A, FAM131B, FAM134B, FAM13B, FAM176A, FAM176B, FAM48A, FANCC,

FANCF, FANCL, FBXO7, FCGR3B, FGF14, FGF7, FGFBP1, FIS1, FNBP1L, FOXO1, FUNDC1, FUNDC2, FXR2, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, GABARAPL3, GABRA5, GDF5, GMIP, HAP1, HAPLN1, HBXIP, HCAR1, HDAC6, HGS, HIST1H3A, HIST1H3B, HIST1H3C, HIST1H3D, HIST1H3E, HIST1H3F, HIST1H3G, HIST1H3H, HIST1H3I, HIST1H3J, HK2, HMGB1, HPR, HSF2BP, HSP90AA1, HSPA8, IFI16, IPPK, IRGM, IST1, ITGB4, ITPKC, KCNK3, KCNQ1, KIAA0226, KIAA1324, KRCC1, KRT15, KRT73, LAMP1, LAMP2, LAMTOR1, LAMTOR2, LAMTOR3, LARP1B, LENG9, LGALS8, LIX1, LIX1L, LMCD1, LRRK2, LRSAM1, LSM4, MAP1A, MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3B2, MAP1LC3C, MAP1S, MAP2K1, MAP3K12, MARK2, MBD5, MDH1, MEX3C, MFN1, MFN2, MLST8, MRPS10, MRPS2, MSTN, MTERFD1, MTMR14, MTMR3, MTOR, MTSS1, MYH11, MYLK, MYOM1, NBR1, NDUFB9, NEFM, NHLRC1, NME2, NPC1, NR2C2, NRBF2, NTHL1, NUP93, OBSCN, OPTN, P2RX5, PACS2, PARK2, PARK7, PDK1, PDK4, PEX13, PEX3, PFKP, PGK2, PHF23, PHYHIP, PI4K2A, PIK3C3, PIK3CA, PIK3CB, PIK3R4, PINK1, PLEKHM1, PLOD2, PNPO, PPARGC1A, PPY, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1, PRKAG2, PRKAG3, PRKD2, PRKG1, PSEN1, PTPN22, RAB12, RAB1A, RAB1B, RAB23, RAB24, RAB33B, RAB39, RAB7A, RB1CC1, RBM18, REEP2, REP15, RFWD3, RGS19, RHEB, RIMS3, RNF185, RNF41, RPS27A, RPTOR, RRAGA, RRAGB, RRAGC, RRAGD, S100A8, S100A9, SCN1A, SERPINB10, SESN2, SFRP4, SH3GLB1, SIRT2, SLC1A3, SLC1A4, SLC22A3, SLC25A19, SLC35B3, SLC35C1, SLC37A4, SLC6A1, SLCO1A2, SMURF1, SNAP29, SNAPIN, SNF8, SNRPB, SNRPB2, SNRPD1, SNRPF, SNTG1, SNX14, SPATA18, SQSTM1, SRPX, STAM, STAM2, STAT2, STBD1, STK11, STK32A, STOM, STX12, STX17, SUPT3H, TBC1D17, TBC1D25, TBC1D5, TCIRG1, TEAD4, TECPR1, TECPR2, TFEB, TM9SF1, TMBIM6, TMEM203, TMEM208, TMEM39A, TMEM39B, TMEM59, TMEM74, TMEM93, TNIK, TOLLIP, TOMM20, TOMM22, TOMM40, TOMM5, TOMM6, TOMM7, TOMM70A, TP53INP1, TP53INP2, TRAPPC8, TREM1, TRIM17, TRIM5, TSG101, TXLNA, UBA52, UBB, UBC, UBQLN1, UBQLN2, UBQLN4, ULK1, ULK2, ULK3, USP10, USP13, USP30, UVRAG, VAMP7, VAMP8, VDAC1, VMP1, VPS11, VPS16, VPS18, VPS25, VPS28, VPS33A, VPS33B, VPS36, VPS37A, VPS37B, VPS37C, VPS37D, VPS39, VPS41, VPS4A, VPS4B, VTA1, VTI1A, VTI1B, WDFY3, WDR45, WDR45L, WIPI1, WIPI2, XBP1, YIPF1, ZCCHC17, ZFYVE1, ZKSCAN3, ZNF189, ZNF593 и ZNF681.

Набор генов "активируемые в покоящемся состоянии относительно подавляемых в активированном состоянии" включает следующие гены: ABCA7, ABCF3, ACAP2, AMT, ANKH, ATF7IP2, ATG14, ATP1A1, ATXN7, ATXN7L3B, BCL7A, BEX4, BSDC1, BTG1, BTG2, BTN3A1, C11orf21, C19orf22, C21orf2, CAMK2G, CARS2, CCNL2, CD248, CD5, CD55, CEP164, CHKB, CLK1, CLK4, CTSL1, DBP, DCUN1D2, DENND1C, DGKD, DLG1, DUSP1, EAPP, ECE1, ECHDC2, ERBB2IP, FAM117A, FAM134B, FAM134C, FAM169A, FAM190B, FAU, FLJ10038, FOXJ2, FOXJ3, FOXL1, FOXO1, FXYD5, FYB, HLA-E, HSPA1L, HYAL2, ICAM2, IFIT5, IFITM1, IKBKB, IQSEC1, IRS4, KIAA0664L3, KIAA0748, KLF3, KLF9, KRT18, LEF1, LINC00342, LIPA, LIPT1, LLGL2, LMBR1L,

LPAR2, LTBP3, LYPD3, LZTFL1, MANBA, MAP2K6, MAP3K1, MARCH8, MAU2, MGEA5, MMP8, MPO, MSL1, MSL3, MYH3, MYLIP, NAGPA, NDST2, NISCH, NKTR, NLRP1, NOSIP, NPIP, NUMA1, PAIP2B, PAPD7, PBXIP1, PCIF1, PI4KA, PLCL2, PLEKHA1, PLEKHF2, PNISR, PPFIBP2, PRKCA, PRKCZ, PRKD3, PRMT2, PTP4A3, PXN, RASA2, RASA3, RASGRP2, RBM38, REPIN1, RNF38, RNF44, ROR1, RPL30, RPL32, RPLP1, RPS20, RPS24, RPS27, RPS6, RPS9, RXRA, RYK, SCAND2, SEMA4C, SETD1B, SETD6, SETX, SF3B1, SH2B1, SLC2A4RG, SLC35E2B, SLC46A3, SMAGP, SMARCE1, SMPD1, SNPH, SP140L, SPATA6, SPG7, SREK1IP1, SRSF5, STAT5B, SVIL, SYF2, SYNJ2BP, TAF1C, TBC1D4, TCF20, TECTA, TES, TMEM127, TMEM159, TMEM30B, TMEM66, TMEM8B, TP53TG1, TPCN1, TRIM22, TRIM44, TSC1, TSC22D1, TSC22D3, TSPYL2, TTC9, TTN, UBE2G2, USP33, USP34, VAMP1, VILL, VIPR1, VPS13C, ZBED5, ZBTB25, ZBTB40, ZC3H3, ZFP161, ZFP36L1, ZFP36L2, ZHX2, ZMYM5, ZNF136, ZNF148, ZNF318, ZNF350, ZNF512B, ZNF609, ZNF652, ZNF83, ZNF862 и ZNF91.

Набор генов "постепенно активируемые при дифференцировке в клетки памяти" включает следующие гены: MTCH2, RAB6C, KIAA0195, SETD2, C2orf24, NRD1, GNA13, COPA, SELT, TNIP1, CBFA2T2, LRP10, PRKCI, BRE, ANKS1A, PNPLA6, ARL6IP1, WDFY1, MAPK1, GPR153, SHKBP1, MAP1LC3B2, PIP4K2A, HCN3, GTPBP1, TLN1, C4orf34, KIF3B, TCIRG1, PPP3CA, ATG4D, TYMP, TRAF6, C17orf76, WIPF1, FAM108A1, MYL6, NRM, SPCS2, GGT3P, GALK1, CLIP4, ARL4C, YWHAQ, LPCAT4, ATG2A, IDS, TBC1D5, DMPK, ST6GALNAC6, REEP5, ABHD6, KIAA0247, EMB, TSEN54, SPIRE2, PIWIL4, ZSCAN22, ICAM1, CHD9, LPIN2, SETD8, ZC3H12A, ULBP3, IL15RA, HLA-DQB2, LCP1, CHP, RUNX3, TMEM43, REEP4, MEF2D, ABL1, TMEM39A, PCBP4, PLCD1, CHST12, RASGRP1, C1orf58, C11orf63, C6orf129, FHOD1, DKFZp434F142, PIK3CG, ITPR3, BTG3, C4orf50, CNNM3, IFI16, AK1, CDK2AP1, REL, BCL2L1, MVD, TTC39C, PLEKHA2, FKBP11, EML4, FANCA, CDCA4, FUCA2, MFSD10, TBCD, CAPN2, IQGAP1, CHST11, PIK3R1, MYO5A, KIR2DL3, DLG3, MXD4, RALGDS, S1PR5, WSB2, CCR3, TIPARP, SP140, CD151, SOX13, KRTAP5-2, NF1, PEA15, PARP8, RNF166, UEVLD, LIMK1, CACNB1, TMX4, SLC6A6, LBA1, SV2A, LLGL2, IRF1, PPP2R5C, CD99, RAPGEF1, PPP4R1, OSBPL7, FOXP4, SLA2, TBC1D2B, ST7, JAZF1, GGA2, PI4K2A, CD68, LPGAT1, STX11, ZAK, FAM160B1, RORA, C8orf80, APOBEC3F, TGFBI, DNAJC1, GPR114, LRP8, CD69, CMIP, NAT13, TGFB1, FLJ00049, ANTXR2, NR4A3, IL12RB1, NTNG2, RDX, MLLT4, GPRIN3, ADCY9, CD300A, SCD5, ABI3, PTPN22, LGALS1, SYTL3, BMPR1A, TBK1, PMAIP1, RASGEF1A, GCNT1, GABARAPL1, STOM, CALHM2, ABCA2, PPP1R16B, SYNE2, PAM, C12orf75, CLCF1, MXRA7, APOBEC3C, CLSTN3, ACOT9, HIP1, LAG3, TNFAIP3, DCBLD1, KLF6, CACNB3, RNF19A, RAB27A, FADS3, DLG5, APOBEC3D, TNFRSF1B, ACTN4, TBKBP1, ATXN1, ARAP2, ARHGEF12, FAM53B, MAN1A1, FAM38A, PLXNC1, GRLF1, SRGN, HLA-DRB5, B4GALT5, WIPI1, PTPRJ, SLFN11, DUSP2, ANXA5, AHNAK, NEO1, CLIC1, EIF2C4, MAP3K5, IL2RB, PLEKHG1, MYO6, GTDC1, EDARADD, GALM, TARP, ADAM8, MSC, HNRPLL, SYT11, ATP2B4, NHSL2, MATK, ARHGAP18, SLFN12L, SPATS2L, RAB27B, PIK3R3, TP53INP1,

MBOAT1, GYG1, KATNAL1, FAM46C, ZC3HAV1L, ANXA2P2, CTNNA1, NPC1, C3AR1, CRIM1, SH2D2A, ERN1, YPEL1, TBX21, SLC1A4, FASLG, PHACTR2, GALNT3, ADRB2, PIK3AP1, TLR3, PLEKHA5, DUSP10, GNAO1, PTGDR, FRMD4B, ANXA2, EOMES, CADM1, MAF, TPRG1, NBEAL2, PPP2R2B, PELO, SLC4A4, KLRF1, FOSL2, RGS2, TGFBR3, PRF1, MYO1F, GAB3, C17orf66, MICAL2, CYTH3, TOX, HLA-DRA, SYNE1, WEE1, PYHIN1, F2R, PLD1, THBS1, CD58, FAS, NETO2, CXCR6, ST6GALNAC2, DUSP4, AUTS2, C1orf21, KLRG1, TNIP3, GZMA, PRR5L, PRDM1, ST8SIA6, PLXND1, PTPRM, GFPT2, MYBL1, SLAMF7, FLJ16686, GNLY, ZEB2, CST7, IL18RAP, CCL5, KLRD1 и KLRB1.

Набор генов "активируемые в TEM относительно подавляемых в TN" включает следующие гены: MYO5A, MXD4, STK3, S1PR5, GLCCI1, CCR3, SOX13, KRTAP5-2, PEA15, PARP8, RNF166, UEVLD, LIMK1, SLC6A6, SV2A, KPNA2, OSBPL7, ST7, GGA2, PI4K2A, CD68, ZAK, RORA, TGFBI, DNAJC1, JOSD1, ZFYVE28, LRP8, OSBPL3, CMIP, NAT13, TGFB1, ANTXR2, NR4A3, RDX, ADCY9, CHN1, CD300A, SCD5, PTPN22, LGALS1, RASGEF1A, GCNT1, GLUL, ABCA2, CLDND1, PAM, CLCF1, MXRA7, CLSTN3, ACOT9, METRNL, BMPR1A, LRIG1, APOBEC3G, CACNB3, RNF19A, RAB27A, FADS3, ACTN4, TBKBP1, FAM53B, MAN1A1, FAM38A, GRLF1, B4GALT5, WIPI1, DUSP2, ANXA5, AHNAK, CLIC1, MAP3K5, ST8SIA1, TARP, ADAM8, MATK, SLFN12L, PIK3R3, FAM46C, ANXA2P2, CTNNA1, NPC1, SH2D2A, ERN1, YPEL1, TBX21, STOM, PHACTR2, GBP5, ADRB2, PIK3AP1, DUSP10, PTGDR, EOMES, MAF, TPRG1, NBEAL2, NCAPH, SLC4A4, FOSL2, RGS2, TGFBR3, MYO1F, C17orf66, CYTH3, WEE1, PYHIN1, F2R, THBS1, CD58, AUTS2, FAM129A, TNIP3, GZMA, PRR5L, PRDM1, PLXND1, PTPRM, GFPT2, MYBL1, SLAMF7, ZEB2, CST7, CCL5, GZMK и KLRB1.

Другие наборы генов, описывающие аналогичные процессы и/или характеристики, могут также использоваться для определения характеристик фенотипов клеток, описанных выше.

Использовали Cell Ranger VDJ для получения последовательностей и аннотаций VDJ одиночных клеток для каждой 5'-библиотеки одиночной клетки. Программное обеспечение Loupe Cell Browser и пакеты Bioconductor использовали для анализа и визуализации данных.

Результаты

Целью данного примера является сравнение состояния Т-клеток между очищенными Т-клетками, которые выступали в качестве исходных клеток, CAR-T-клетками, изготовленными с применением способа ARM (обозначенными как клетки "дня 1"), и CAR-T-клетками, изготовленными с применением способа TM (обозначенными как клетки "дня 9"), с помощью секвенирования РНК одиночных клеток (scRNA-seq). Кроме того, проводили секвенирование TCR одиночных клеток (scTCR-seq) для исследования клональности и отслеживания дифференцировки клеток от исходного материала до материала после изготовления.

Как показано на фиг. 37A-37C, исходные клетки характеризовались наименьшей

экспрессией генов и UMI, что позволяет предположить, что такие клетки не были транскрипционно активными и находились в покоящемся состоянии. Клетки дня 1 и дня 9 экспрессировали больше генов, при этом клетки дня 9 были наиболее транскрипционно активными. Аналогичные результаты показаны на фиг. 38A-38D. Исходные клетки не экспрессировали гены, отвечающие за пролиферацию (фиг. 38A и 38D).

Дополнительные данные анализа набора генов показаны на фиг. 39A-39E. Разные популяции клеток сравнивали с использованием медианных баллов наборов генов. Клетки дня 1 и исходные клетки находились в более молодом состоянии, более подобном стволовым клеткам памяти (фиг. 39A-39C). На фиг. 39A значения медианного балла набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для клеток дня 1, клеток дня 9 и исходных клеток составляют -0,084, 0,035 и -0,1 соответственно. На фиг. 39B значения медианного балла набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для клеток дня 1, клеток дня 9 и исходных клеток составляют -0,082, 0,087 и -0,071 соответственно. На фиг. 39C значения медианного балла набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для клеток дня 1, клеток дня 9 и исходных клеток составляют -0,062, 0,14 и -0,081 соответственно.

Кроме того, клетки дня 1 находились в более оптимальном метаболическом состоянии по сравнению с клетками дня 9 (фиг. 39D и 39E). На фиг. 39D значения медианного балла набора генов (активируемые при гипоксии) для клеток дня 1, клеток дня 9 и исходных клеток составляют 0,019, 0,11 и -0,096 соответственно. На фиг. 39E значения медианного балла набора генов (активируемые при аутофагии) для клеток дня 1, клеток дня 9 и исходных клеток составляют 0,066, 0,11 и -0,09 соответственно.

Исходные клетки включали четыре кластера, выделенные на основании экспрессии генов. Кластер 0 характеризуется высокой экспрессией LMNA, S100A4 и т. д. Кластер 1 характеризуется высокой экспрессией RP913, PRKCQ-AS1 и т. д. Кластер 2 характеризуется высокой экспрессией PR11-291B21.2, CD8B и т. д. Кластер 3 характеризуется высокой экспрессией NKG7, GZMH, CCL5, CST7, GNLY, FGFBP2, GZMA, CCL4, CTSW, CD8A и т. д. На графике, построенном методом нелинейного снижения размерности и визуализации многомерных переменных (TSNE), для исходных клеток кластер 3 отделялся от других клеток, и кластер 1 и кластер 2 было тяжело различить.

В соответствии с анализом набора генов, показанным на фиг. 40A-40C, кластер 0 и кластер 3 были обогащены фенотипом регуляторных Т-клеток по сравнению с кластером 1 и кластером 2, которые были обогащены фенотипом эффекторных Т-клеток. В кластере 3 преобладали поздние Т-клетки памяти/эффекторные Т-клетки памяти (TEM), в кластере 1 и кластере 2 - ранние Т-клетки памяти и необученные Т-клетки, и кластер 0 находится посередине. Большинство исходных клеток находились в состоянии необученных и ранних Т-клеток памяти. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что такие клетки могут проявлять себя лучше всего в ходе процедуры изготовления.

Меньшая транскрипционная гетерогенность наблюдалась у клеток дня 1 и клеток

дня 9 (данные не показаны).

Как и исходная популяция, клетки дня 1 демонстрировали более крупный кластер ранних клеток памяти и менее крупный кластер поздних клеток памяти на графике TSNE аналогично тому, что наблюдалось с кластером 3 исходных клеток B отличие от этого, клетки дня 9 не демонстрировали отдельных кластеров ранних клеток памяти на графике TSNE. Это означает, что ко дню 9 клетки стали более однородными.

Секвенировали TCR, и измеряли разнообразие клонотипов. В целом, три профиля клонотипов были очень плоскими - большинство клонов встречались только один раз (фиг. 41A-41C и таблица 24). Энтропия Шэннона в таблице 24 является мерой плосковершинности распределения. Преобладающими клонами в исходных клетках являлись поздние клетки памяти. График для клеток дня 1 выглядел сходно с графиком для исходных клеток, но начинал выравниваться. Ко дню 9 график для преобладающих клонов существенно выравнивался, и распределение было намного более плосковершинным. Показатель разнообразия был наиболее высоким в день 9, поскольку для клеток дня 9 наблюдалось намного более равномерное и плосковершинное распределение, чем для исходных клеток или клеток дня 1.

Таблица 24. Показатели разнообразия TCR

	Исходные клетки	Продукт дня 1	Продукт дня 9
Среднее количество клонов на клонотип	1,10	1,05	1,07
Оценочное количество клеток	7344	7687	7233
Общее количество клонотипов	5325	7403	6736
Разнообразие	342,27	802,94	3382,62
Нормализованная энтропия Шеннона	9,98E-01	9,95E-01	9,96E-01

Сводка результатов

Наблюдались значительные отличия в состоянии Т-клеток между продуктами дня 1 и дня 9. Клетки дня 1 были намного более подобными исходным клеткам и характеризовались обогащением сигнатурами стволовости, что указывало на более эффективный продукт.

Пример 11. Открытое исследование CAR-T-клеток, направленных на антиген созревания B-клеток (BCMA), фазы I у взрослых пациентов с рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломой (ММ)

В данном исследовании оценивается безопасность и переносимость терапии с использованием Т-клеток с CAR для BCMA у взрослых субъектов с ММ, у которых проявляется рецидив и/или рефрактерность к по меньшей мере 2 предшествующим

режимам лечения, включая IMiD (например, леналидомид или помалидомид), ингибитор протеасом (например, бортезомиб, карфилзомиб) и одобренное антитело к CD38 (например, даратумумаб), при наличии таковых и у которых имеется документально подтвержденное свидетельство прогрессирования заболевания (согласно критериям IMWG).

CAR для BCMA содержит scFv для BCMA из PI61, шарнирную и трансмембранную области CD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета. В данном исследовании продукты на основе Т-клеток с CAR для BCMA изготовлены с применением способа быстрого изготовления с активацией (ARM). Такие клетки называются "ARM-CAR для BCMA". В частности, Т-клетки обогащены из единицы лейкафереза субъекта с помощью коммерчески доступных магнитных гранул, захватывающих корецепторы CD4 и CD8 на поверхности Т-клеток. Обогащенные Т-клетки затем стимулируют коллоидной полимерной наноматрицей, ковалентно присоединенной к гуманизированным рекомбинантным агонистическим антителам к CD3 и CD28 человека. Через двадцать четыре часа после высевания, активации и трансдукции CAR-Т-клетки собирают и промывают для удаления остаточного неинтегрировавшегося вектора и несвязавшейся активирующей матрицы. После промывания средство терапии на основе Т-клеток с CAR для BCMA концентрируют и криоконсервируют. Результаты процедуры испытания при выпуске необходимо получить до выпуска продукта для введения.

По сравнению со способом ТМ для CAR-Т-клеток, который основывается на периоде размножения Т-клеток ex vivo, продолжающемся 7-8 дней после трансдукции лентивирусным вектором, способ ARM не включает размножение Т-клеток ex vivo. Напротив, Т-клетки, полученные с применением способа ARM, собирают через 24 часа после переноса генов, обеспечивая их размножение в организмах пациентов in vivo. Предполагается, что большее размножение Т-клеток in vivo, достигаемое с помощью способа ARM, приводит к получению фенотипа менее дифференцированных Т-клеток с сохранением при этом большей фракции стволовых Т-клеток памяти в конечном клеточном продукте. Было установлено, что присутствие менее дифференцированных CAR-Т-клеток памяти ассоциировано с улучшенной противоопухолевой эффективностью в клинических исследованиях (Fraietta JA, et al., (2018) Nat Med, 24(5); 563-71). Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что Т-клетки с CAR для BCMA содержат большую фракцию стволовых Т-клеток памяти, что приводит к повышенному размножению CAR-Т-клеток у пациентов, таким образом преодолевая истощение эффекторных Т-клеток и приводя к более устойчивой эффективности у пациентов с ММ по сравнению с BCMA-CART, полученными в способах традиционного изготовления.

Способ ARM обеспечивает получение CAR-Т-клеток, состоящих из значительно большей доли Т-клеток памяти, подобных необученным (CCR7+/CD45RO-), как в общем продукте, так и в CAR-положительной фракции по сравнению с CAR-Т-клетками, изготовленными с применением способа традиционного изготовления (ТМ). Было

показано, что ARM-CAR для BCMA обеспечивал устранение опухоли в доклинических моделях ММ дозозависимым образом. ARM-CAR для BCMA является в по меньшей мере пять раз более сильным по сравнению с BCMA-CAR-T-клетками, полученными посредством способа TM, и приводит к более длительному размножению CAR-T in vivo с более высокими уровнями системных цитокинов. В совокупности эти результаты подтверждают гипотезу о том, что продукты на основе Т-клеток с CAR для BCMA, изготовленные посредством способа ARM, содержат Т-клетки с выраженным фенотипом стволовых клеток памяти, что приводит к получению продукта на основе BCMA-CAR-T-клеток с усиленными свойствами приживления, размножения и противодействия ММ.

В данном исследовании фазы I каждого субъекта вначале оценивают в отношении пригодности к участию в клиническом исследовании в ходе скрининга. Субъекты, подходящие для включения в данное исследование, должны удовлетворять всем из следующих критериев: (1) возраст ≥ 18 лет на момент подписания ICF; (2) показатель общего состояния по шкале ECOG, составляющий 0 или 1 на момент скрининга; (3) субъекты с ММ, у которых проявляется рецидив и/или рефрактерность к по меньшей мере 2 предшествующим режимам лечения, включая IMiD (например, леналидомид или помалидомид), ингибитор протеасом (например, бортезомиб, карфилзомиб) и одобренное антитело к CD38 (например, даратумумаб) (при наличии таковых), и у которых имеется документально подтвержденное свидетельство прогрессирования заболевания (согласно критериям IMWG); (4) у субъектов должно иметься поддающееся измерению заболевание, определенное по меньшей мере 1 из следующих 3 измерений: М-белок в сыворотке крови ≥ 1,0 г/дл, М-белок в моче ≥ 200 мг/24 часа или свободные легкие цепи в сыворотке крови (sFLC) > 100 мг/л вовлеченных FLC; (5) все пациенты должны подходить для серийной биопсии костного мозга и/или сбора аспирата в соответствии с институциональными руководствами и быть согласны пройти эту повторную процедуру, как описано для данного исследования; (6) субъекты должны удовлетворять следующим гематологическим показателям на момент скрининга: абсолютное количество нейтрофилов (ANC) ≥ 1000/мм^3 (≥ 1×10^9/л) без трансфузионной поддержки в течение 7 дней до тестирования, абсолютное количество CD3+ Т-клеток > 150/мм^3 (> 0,15×10^9/л) без трансфузионной поддержки в течение 7 дней до тестирования, количество тромбоцитов ≥ 50000/мм^3 (≥ 50×10^9/л) и уровень гемоглобина ≥ 8,0 г/дл (≥ 4,9 ммоль/л); (7) пациент должен считаться исследователем подходящим для прохождения режима приема флударабина/циклофосфамида LD; и (8) у него должен иметься материал, полученный путем лейкафереза, из клеток немобилизованной крови, принятых к изготовлению. Если субъект подходит, то у него имеется продукт, полученный путем лейкафереза, собранный и предоставленный для изготовления CAR-T. Субъект считается включенным в исследование при принятии его продукта лейкафереза для начала изготовления.

Субъекты получают лимфодеплеционную химиотерапию (LD) только после того, как была подтверждена доступность конечного продукта. После LD-химиотерапии вводят однократную дозу продукта на основе Т-клеток с CAR для BCMA путем внутривенной

(i.v.) инъекции субъекту в течение 90 минут поле размораживания (фиг. 42). Начальная доза ARM-CAR для BCMA составляла 1×10^7 жизнеспособных CAR-положительных Т-клеток. Доза, составляющая 5×10^7 жизнеспособных CAR-положительных Т-клеток, также тестируется. Каждого субъекта госпитализируют на первые 72 часа после введения Т-клеток с CAR для BCMA.

Для фармакокинетического анализа собираются последовательные образцы крови в различные моменты времени для измерения клеточной кинетики ARM-CAR для BCMA в периферической крови посредством проточной цитометрии и qPCR, в костном мозгу посредством проточной цитометрии и qPCR, для измерения клеточной и гуморальной иммуногенности и для измерения уровней потенциальных фармакодинамических маркеров, в том числе sBCMA, BAFF и APRIL, в периферической крови посредством ELISA. В частности, субъектов анализируют в отношении количества трансгена CAR в периферической крови, костном мозге или других соответствующих тканях; экспрессии на поверхности CAR-положительных Т-клеток в периферической крови или костном мозге; уровней антител к mCAR в сыворотке крови; процентной доли IFN-γ-положительных CD4/CD8 Т-клеток в PBMC; маркеров активации иммунных клеток; растворимых иммунных факторов и цитокинов (например, sBCMA, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNF-α), клональности CAR-T и уровней растворимых BCMA, APRIL и BAFF в сыворотке крови.

Пример 12. Изготовление BCMA-CAR-Т-клеток с применением способа быстрого изготовления с активацией (ARM)

Способ ARM для получения BCMA-CAR-Т-клеток начинается с получения среды, как в общих чертах описано в таблице 25.

Криоконсервированный продукт лейкафереза используют в качестве исходного материала и обрабатывают для обогащения Т-клетками. Документация по аферезу при ее доступности используется для определения процентной доли Т-клеток. При отсутствии данных о процентной доле Т-клеток в документации по аферезу тестирование в сигнальном флаконе проводят на поступающих криоконсервированных продуктах лейкафереза с получением целевой процентной доли Т-клеток для афереза. Результаты для процентной доли Т-клеток определяют то, как много мешков размораживается в день 0 способа ARM.

Таблица 25. Тип среды и буфера и точка применения в ходе изготовления BCMA-CART

Тип среды	Источник	Точка применения
Буфер CliniMACS®/человеческий сывороточный альбумин (HSA) (0,5% в рабочей концентрации)	Получен оператором в день 0	День 0, обработка в устройстве для промывания/разделения клеток
Среда для способа быстрого	Получен оператором в	День 0 для высевания

изготовления	день 0	клеток
PBS/HSA (1% или 2% в рабочей концентрации)	Получен оператором в день 0	Среда для промывания собранного и культивируемого материала (день 1)
Cryostor10 (CS10)	Коммерчески доступный	Составление собранного материала

Криоконсервированный продукт лейкафереза размораживают, промывают и затем подвергают отбору Т-клеток и обогащению Т-клетками с использованием технологии на основе микрогранул CliniMACS®. Жизнеспособные ядросодержащие клетки (VNC) активируют с помощью TransAct (Miltenyi) и подвергают трансдукции с помощью лентивирусного вектора, кодирующего CAR. Жизнеспособные клетки, отобранные с помощью микрогранул Miltenyi, высевают на CentriCult в Prodigy®, который представляет собой инкубационную камеру без увлажнения. Находящиеся в культуре клетки суспендируют в среде для способа быстрого изготовления, которая представляет собой среду на основе OpTmizer™ CTS™, которая содержит добавку CTS™ (ThermoFisher), GlutaMAX, IL-2 и 2% заменитель сыворотки для иммунных клеток вместе с ее компонентами, способствующими активации и трансдукции Т-клеток. Лентивирусную трансдукцию проводят один раз в день высевания после добавления TransAct к разбавленным клеткам в культуральную среду. Лентивирусный вектор будут размораживать непосредственно перед применением в день высевания в течение вплоть до 30 минут при комнатной температуре.

От начала способа в день 0 до начала промывания и сбора культуры BCMA-CAR-Т-клетки культивируют в течение 20-28 часов после высевания. После культивирования суспензию клеток подвергают двум промываниям культивируемого материала и одному промыванию собранного материала в камере CentriCult (Miltenyi Biotech).

После промывания собранного материала на CliniMACS® Prodigy® в день 1 из суспензии клеток отбирают образцы для определения числа и жизнеспособности жизнеспособных клеток. Суспензию клеток затем переносят в центрифугу для осаждения вручную. Надосадочную жидкость удаляют, и клеточный осадок ресуспендируют в CS10 (BioLife Solution), что приводит к получению состава на основе продукта при конечной концентрации DMSO, составляющей ~ 10,0%. Число жизнеспособных клеток составляют в конце сбора для введения дозы. Дозы затем распределяют в отдельные мешки для криоконсервации, и отбор аналитических образцов осуществляют в криофлаконы.

Криоконсервированные продукты хранятся в контролируемых резервуарах для хранения с LN2 в безопасной зоне с ограниченным доступом до окончательного выпуска и транспортировки.

Пример 13. Определение характеристик BCMA-CAR-Т-клеток, изготовленных с применением способа быстрого изготовления с активацией (ARM)

Краткое описание

В данном примере описано определение характеристик BCMA-CAR-T-клеток, изготовленных с применением способа ARM. Способ ARM обеспечивает получение CAR-T-клеток, состоящих из значительно большей доли T-клеток памяти, подобных необученным (CCR7+/CD45RO-), по сравнению с продуктом традиционного изготовления (TM). В доклинической модели множественной миеломы (MM) BCMA-CAR-T-клетки, изготовленные с применением способа ARM, индуцировали регрессию опухоли дозозависимым образом и были более эффективными в уничтожении опухолей вплоть до 5-кратной степени по сравнению с BCMA-CAR-T-клетками, изготовленными с применением способа TM. Кроме того, клетки, изготовленные посредством ARM, демонстрировали более длительное размножение CART in vivo (более высокие Cmax и AUC0-21d вплоть до 3-кратных) и индуцировали продуцирование системных цитокинов на более высоких уровнях (для IFN-γ в 3,5 раза) по сравнению с клетками, изготовленными посредством TM. В совокупности эти результаты подтверждают гипотезу о том, что BCMA-CAR-T-клетки, изготовленные посредством способа ARM, содержат T-клетки с выраженным фенотипом стволовых клеток памяти и повышенным потенциалом размножения in vivo.

При применении способа ARM CAR могут стабильно экспрессироваться через 96 ч. после добавления вируса (также упоминается как через 72 ч. после размораживания продукта). Следовательно, 96 ч. после добавления вируса или 72 ч. после размораживания считается суррогатным моментом времени для экспрессии CAR для активности in vitro и in vivo. BCMA-CAR-T-клетки, изготовленные с применением способа ARM, сохраняют менее дифференцированную популяцию клеток и демонстрируют более высокое продуцирование целевых специфических цитокинов in vitro по сравнению с BCMA-CAR-T-клетками, изготовленными с применением способа TM.

BCMA-CAR-T-клетки, изготовленные с применением способа ARM, демонстрируют высокую специфичность в отношении BCMA при использовании коммерческой микроматрицы белков плазматической мембраны человека. Анализ выявил связывание с BCMA (TNFRSF17), но не выявил других сильных, средних или слабых видов связывания. Скрининг не идентифицировал с какой-либо высокой достоверностью наличия белков, перекрестно реагирующих с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv) антитела к BCMA человека (PI61), экспрессируемым в продукте на основе BCMA-CART. Исследования распределения мишени проводили для определения потенциальной неопухолевой нецелевой токсичности. Анализы методом иммуногистохимического исследования (IHC), гибридизации in situ (ISH) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовались для исследования распределения BCMA в нормальных тканях человека. Такие анализы демонстрируют, что экспрессия BCMA была ограничена участками, содержащими нормальные плазматические клетки (PC), такими как вторичные лимфоидные органы, костный мозг и лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистой оболочкой. Поскольку нейротоксичность в отношении центральной нервной системы

(ЦНС) представляла собой проблему в других видах клеточной терапии, исследовали экспрессию в головном мозге. Окрашивание в ЦНС не наблюдалось ни при иммуногистохимическом исследовании с использованием коммерчески доступного антитела, которое, как было показано, является специфичным в отношении BCMA, ни при анализах связывания с использованием инструмента на основе химерного антитела человека/кролика, содержащего scFv, нацеливающийся на BCMA. Эти полученные данные подтверждались отсутствием мРНК BCMA в этих тканях согласно измерению посредством гибридизации in situ и анализа сплайс-вариантов на основе ПЦР. BCMA-CART, нацеливающиеся на нормальные PC и плазмоцитоидные дендритные клетки, экспрессирующие BCMA, вероятно, приводят к их истощению; однако нацеливание на другие типы клеток не предполагается.

Результаты

В исследованиях, описанных ниже, сравнивались BCMA-CAR-T-клетки, изготовленные с применением способа ARM (называемые "ARM-CAR для BCMA"), с BCMA-CAR-T-клетками, изготовленными с применением способа TM (называемыми "TM-CAR для BCMA" или "TM-CAR для BCMA*"). CAR, экспрессируемый в ARM-CAR для BCMA, и CAR, экспрессируемый в TM-CAR для BCMA*, имеют одну и ту же последовательность, содержащую scFv из PI61, шарнирную и трансмембранную области CD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета. CAR, экспрессируемый в TM-CAR для BCMA, содержит scFv BCMA10, шарнирную и трансмембранную области CD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета.

*Кинетика экспрессии ARM-*CAR *для BCMA in vitro*

В отличие от TM, в котором измеряется лентивирусная интеграция трансгена CAR через 8-9 дней, в способе ARM трансген в лентивирусе может не полностью интегрироваться и в действительности экспрессируется в течение 24 ч. после добавления лентивируса, поскольку может иметь место лентивирусная псевдотрансдукция (Haas DL, et al., (2000) Mol Ther; 2(1):71-80; Galla M, et al., (2004) Mol Cell; 16(2):309-15). Следовательно, паттерн экспрессии CAR для BCMA оценивали с течением времени путем более длительного культивирования ARM-CAR для BCMA in vitro в присутствии или при отсутствии 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT) для оценивания потенциальной псевдотрансдукции относительно стабильной интеграции и экспрессии трансгена CAR. Анализы методом проточной цитометрии (FACS) проводили для выявления поверхностной экспрессии CAR через 24 ч., 48 ч., 72 ч., 96 ч. и 168 ч. после активации и трансдукции Т-клеток лентивирусным вектором. В некоторых случаях ARM-CAR для BCMA и аликвоту данного продукта замораживали незамедлительно при сборе для определения дополнительных характеристик в других анализах.

Как показано на фиг. 43, анализы методом FACS указывают на то, что CAR для BCMA практически не проявлял экспрессию через 24 ч. после добавления лентивирусного вектора. Однако CAR+ популяция первоначально появлялась через 48 ч. CAR+ популяция

незначительно увеличивалась в каждый момент времени от 48 ч. до 168 ч. после добавления вируса. CAR, по-видимому, стабильно экспрессировался, начиная с 96 ч. Это отличается от нетрансдуцированных (UTD) и обработанных AZT образцов, которые не демонстрировали CAR+ популяцию в какой-либо момент времени после 48 ч. (фиг. 43). AZT был способен эффективно ингибировать экспрессию CAR как при дозе 30 мкМ, так и при дозе 100 мкМ, что позволяет предположить, что экспрессия CAR для BCMA обусловлена интеграцией вирусного гена в геном клетки-хозяина и маловероятно является следствием лентивирусной псевдотрансдукции.

ARM-*CAR для BCMA обеспечивает сохранение стволовости Т-клеток*

ARM-CAR для BCMA и TM-CAR для BCMA анализировали с помощью FACS для оценивания экспрессии CAR при размораживании, а также фенотипа Т-клеток через 48 ч. после размораживания (фиг. 44A и 44B). CAR для BCMA практически не поддавался выявлению при размораживании, как наблюдалось у двух доноров (фиг. 44A), что соответствует наблюдению в исследовании кинетики экспрессии CAR, показанному на фиг. 43. Однако через 48 ч. после размораживания экспрессия CAR для BCMA составляла 32,9% для ARM-CAR для BCMA. В отличие от этого, TM-CAR для BCMA проявлял экспрессию CAR для BCMA, составляющую 7% (фиг. 44B). Анализ фенотипа CAR+ Т-клеток выявил, что способ ARM обеспечивал сохранение Т-клеток, подобных необученным (60% CD45RO-/CCR7+), популяция которых оказалась в 26 раз большей, чем популяция эффекторных Т-клеток памяти (CD45RO+/CCR7-). Способ TM приводил к получению главным образом центральных Т-клеток памяти (81% CD45RO+/CCR7+) среди CAR+ Т-клеток. Популяция Т-клеток, подобных необученным, практически отсутствовала при применении способа TM. Данная популяция необученных Т-клеток в значительной степени перекрывается с CD45RO-/CD27+ стволовыми Т-клетками (что описано в Cohen AD, et al., (2019) J Clin Invest; 129(6):2210-21; и Fraietta, et al (2018) Nat Med, 24(5); 563-571) и ассоциирована с усиленным размножением CART и клиническими ответами.

В дополнение к его фенотипу, конечный продукт на основе клеток с ARM-CAR для BCMA также оценивали в отношении его активации in vitro. ARM-CAR для BCMA и TM-CAR для BCMA размораживали и совместно культивировали с линией клеток KMS-11, экспрессирующей BCMA. Клетки с ARM-CAR для BCMA после размораживания оставляли в покоящемся состоянии на 24 ч. перед формированием совместной культуры. Сравнение уровней цитокинов в надосадочных жидкостях через 24 часа после совместного культивирования выявило 5-кратное увеличение уровней IL-2 и 2-кратное увеличение уровней IFN-γ, секретируемых ARM-CAR для BCMA, по сравнению с TM-CAR для BCMA, как показано на фиг. 45A и 45B. Эксперименты с UTD клетками, подвергнутыми способу ARM или TM, подтверждали BCMA-специфичное распознавание с помощью ARM-CAR для BCMA и TM-CAR для BCMA. Однако более высокая фоновая секреция IFN-γ ARM-UTD при отсутствии BCMA-специфичной стимуляции (фиг. 45B), вероятно, обусловлена активированной природой продуктов, полученных посредством способа ARM.

Таким образом, способ ARM, применяемый для получения CAR-T-клеток для BCMA, обеспечил получение Т-клеток с уровнем экспрессии CAR, выше, чем при способе TM. ARM-CAR для BCMA демонстрирует BCMA-специфичную активацию in vitro и секретирует IL-2 на более высоких уровнях по сравнению с TM-CAR для BCMA, что коррелирует с его фенотипом стволовых Т-клеток.

Эффективность ARM-CAR для BCMA и TM-CAR для BCMA в ксенотрансплантатной модели

Фармакологические исследования in vivo применяли для определения направления разработки ARM-CAR для BCMA. Для эксперимента, описанного на фиг. 46, ARM-CAR для BCMA получали с использованием материала, соответствующего GMP. Параллельно с этим получали TM-CAR для BCMA с использованием той же партии Т-клеток, но посредством TM. Для расчета дозы с использованием ARM-CAR для BCMA использовали измерение % CAR+ через 72 ч. после размораживания продукта для расчета дозы; тогда как для TM-CAR для BCMA использовали % CAR+ в продуктах дня 9, полученных посредством способа TM, для расчета дозы. Эффективность CAR-T-клеток, полученных с применением разных способов, оценивали у мышей NSG с иммунодефицитом (NOD-scid IL2Rg-нулевых), которым инокулировали линию клеток MM KMS-11-Luc. Данная линия опухолевых клеток приживляется в костном мозге. Через восемь дней после инокуляции MM мыши в когортах получали однократную инфузию CAR+ Т-клеток. Дозы нормализовали по общему количеству CAR-T-клеток для соответствующей дозовой группы. UTD Т-клетки получали аналогичным образом и вводили как независимую группу для контроля аллогенного ответа на опухоль. Доза UTD отражала наиболее высокую дозу общей популяции Т-клеток в соответствующем способе, которой можно было достичь при применении как TM, так и ARM.

Таблица 26. Краткое описание плана исследования для разных дозовых групп и моментов времени для измерения фармакокинетики в крови (PK) и уровней цитокинов в плазме крови

Способ получения клеток	Группа/когорта	CAR+ продукт/мышь	Клеточная кинетика в крови и уровни цитокинов в плазме крови после инъекции CAR-T
	PBS		Цитокины: дни 2, 7, 14 и 21 PK: дни 7, 14 и 21
ARM	UTD		
	ARM-CAR для BCMA	$1{,}5e^5$	
	ARM-CAR для BCMA	$5e^4$	
	ARM-CAR для BCMA	$1e^4$	
TM	UTD		
	TM-CAR для BCMA	$5e^5$	

	TM-CAR для BCMA	$1,5e^5$	
	TM-CAR для BCMA	$5e^4$	

На фиг. 47 представлена кривая регрессии опухоли для всех групп. Оба продукта на основе BCMA-CART (ARM-CAR для BCMA и TM-CAR для BCMA) были способны устранять опухоль при всех тестируемых уровнях дозы, даже в группе с наиболее низкой дозой. Регрессия опухоли индуцировалась дозозависимым образом. Появление эффекта уничтожения опухоли было замедлено на приблизительно неделю в группе с низкой дозой по сравнению с группой с высокой дозой. ARM-CAR для BCMA индуцировал сходную регрессию опухоли при дозах в 3-5 раз ниже, чем для TM-CAR для BCMA, что указывает на то, что ARM-CAR для BCMA является в 3-5 раз более сильным по сравнению с TM-CAR для BCMA при уничтожении опухоли.

Более того, в данном исследовании также оценивали эффективность TM-CAR для BCMA*. TM-CAR для BCMA* и ARM-CAR для BCMA экспрессировали один и тот же CAR для BCMA, но были изготовлены с применением разных способов: способа TM и способа ARM соответственно. Результаты демонстрировали, что ARM-CAR для BCMA индуцировал сходную регрессию опухоли при дозах в 1-5 раз ниже, чем для TM-CAR для BCMA*.

У всех мышей отбирали кровь в дни 2, 7, 14 и 21 после терапии с использованием CAR-T-клеток для измерения уровня IFN-γ в плазме крови (фиг. 48A-48C). Ранний пик не наблюдался, и во всех группах демонстрировался очень низкий уровень циркулирующих IFN-γ (< 10 пг/мл) в день 2. Пики для всех групп наблюдались в течение 14 дней после введения дозы CART. Однако уровни IFN-γ были в 3,5 раз выше для ARM-CAR для BCMA по сравнению с TM-CAR для BCMA. В группах ARM-UTD продуцировалось небольшое количество IFN-γ или не продуцировался таковой в день 2 и день 7 до окончания исследования. Уровень IFN-γ снижался в группах с более высокой дозой в день 21 по сравнению с группами ARM-CAR для BCMA 1e4 и TM-CAR для BCMA 5e4, поскольку CAR+ Т-клетки по-прежнему размножались с замедленным ингибированием опухоли в этих двух группах.

Клеточная кинетика ARM-CAR для BCMA in vivo

В качестве части данного фармакологического исследования для оценки эффективности у мышей NSG размножение CAR-T-клеток в периферической крови анализировали с помощью FACS в течение вплоть до 3 недель после инфузии. Во всех группах, получавших обработку с помощью CART, наблюдалось размножение как CD3+ Т-клеток, так и CAR+ Т-клеток. Не наблюдалось явно выраженного дозозависимого размножения для ARM-CAR для BCMA или TM-CAR для BCMA в том, что касается Cmax или AUC0-21d. Пик размножения клеток для ARM-CAR для BCMA или MTV273 не достигался в течение 21 дня. Однако TM-CAR для BCMA в дозовой группе 5e5 и ARM-CAR для BCMA в дозовой группе 0,5e5 достигали кажущегося пика размножения в день 14 (фиг. 49). Сравнение размножения ARM-BCMA CAR с таковым у TM-BCMA CAR через 21 день выявило, что как Cmax, так и AUC0-21d для ARM-BCMA CAR были в 2-3

раза выше.

Пример 14. Изготовление BCMA-CAR-T-клеток с применением способа быстрого изготовления с активацией (ARM) с использованием IL-15 или hetIL-15 (IL-15/sIL-15Ra)

Способ ARM для получения BCMA-CAR-T-клеток начинается с получения среды, как в общих чертах описано в таблице 25.

Криоконсервированный продукт лейкафереза используют в качестве исходного материала и обрабатывают для обогащения Т-клетками. Документация по аферезу при ее доступности используется для определения процентной доли Т-клеток. При отсутствии данных о процентной доле Т-клеток в документации по аферезу тестирование в сигнальном флаконе проводят на поступающих криоконсервированных продуктах лейкафереза с получением целевой процентной доли Т-клеток для афереза. Результаты для процентной доли Т-клеток определяют то, как много мешков размораживается в день 0 способа ARM.

Криоконсервированный продукт лейкафереза размораживают, промывают и затем подвергают отбору Т-клеток и обогащению Т-клетками с использованием технологии на основе микрогранул CliniMACS®. Жизнеспособные ядросодержащие клетки (VNC) активируют с помощью TransAct (Miltenyi) и подвергают трансдукции с помощью лентивирусного вектора, кодирующего CAR. Жизнеспособные клетки, отобранные с помощью микрогранул Miltenyi, высевают на CentriCult в Prodigy®, который представляет собой инкубационную камеру без увлажнения. Находящиеся в культуре клетки суспендируют в среде для способа быстрого изготовления, которая представляет собой среду на основе OpTmizer™ CTS™, которая содержит добавку CTS™ (ThermoFisher), GlutaMAX, IL-15 или hetIL-15 (IL-15/sIL-15Ra) и 2% заменитель сыворотки для иммунных клеток вместе с ее компонентами, способствующими активации и трансдукции Т-клеток. Лентивирусную трансдукцию проводят один раз в день высевания после добавления TransAct к разбавленным клеткам в культуральную среду. Лентивирусный вектор будут размораживать непосредственно перед применением в день высевания в течение вплоть до 30 минут при комнатной температуре.

От начала способа в день 0 до начала промывания и сбора культуры BCMA-CAR-Т-клетки культивируют в течение 20-28 часов после высевания. После культивирования суспензию клеток подвергают двум промываниям культивируемого материала и одному промыванию собранного материала в камере CentriCult (Miltenyi Biotech).

После промывания собранного материала на CliniMACS® Prodigy® в день 1 из суспензии клеток отбирают образцы для определения числа и жизнеспособности жизнеспособных клеток. Суспензию клеток затем переносят в центрифугу для осаждения вручную. Надосадочную жидкость удаляют, и клеточный осадок ресуспендируют в CS10 (BioLife Solution), что приводит к получению состава на основе продукта при конечной концентрации DMSO, составляющей ~ 10,0%. Число жизнеспособных клеток составляют в конце сбора для введения дозы. Дозы затем распределяют в отдельные мешки для криоконсервации, и отбор аналитических образцов осуществляют в криофлаконы.

Криоконсервированные продукты хранятся в контролируемых резервуарах для хранения с LN2 в безопасной зоне с ограниченным доступом до окончательного выпуска и транспортировки.

В некоторых вариантах осуществления IL-15 или hetIL-15, используемый в среде на основе OpTmizer™ CTS™, может быть заменен на IL-6 или IL-6/sIL-6Ra.

Пример 15. Изготовление CD19-CAR-T-клеток с применением способа быстрого изготовления с активацией (ARM)

Способ ARM для получения CD19-CAR-T-клеток начинается с получения среды, как в общих чертах описано в таблице 25.

Криоконсервированный продукт лейкафереза используют в качестве исходного материала и обрабатывают для обогащения Т-клетками. Документация по аферезу при ее доступности используется для определения процентной доли Т-клеток. При отсутствии данных о процентной доле Т-клеток в документации по аферезу тестирование в сигнальном флаконе проводят на поступающих криоконсервированных продуктах лейкафереза с получением целевой процентной доли Т-клеток для афереза. Результаты для процентной доли Т-клеток определяют то, как много мешков размораживается в день 0 способа ARM.

Криоконсервированный продукт лейкафереза размораживают, промывают и затем подвергают отбору Т-клеток и обогащению Т-клетками с использованием технологии на основе микрогранул CliniMACS®. Жизнеспособные ядросодержащие клетки (VNC) активируют с помощью TransAct (Miltenyi) и подвергают трансдукции с помощью лентивирусного вектора, кодирующего CAR. Жизнеспособные клетки, отобранные с помощью микрогранул Miltenyi, высевают на CentriCult в Prodigy®, который представляет собой инкубационную камеру без увлажнения. Находящиеся в культуре клетки суспендируют в среде для способа быстрого изготовления, которая представляет собой среду на основе OpTmizer™ CTS™, которая содержит добавку CTS™ (ThermoFisher), GlutaMAX, IL-2 и 2% заменитель сыворотки для иммунных клеток вместе с ее компонентами, способствующими активации и трансдукции Т-клеток. Лентивирусную трансдукцию проводят один раз в день высевания после добавления TransAct к разбавленным клеткам в культуральную среду. Лентивирусный вектор будут размораживать непосредственно перед применением в день высевания в течение вплоть до 30 минут при комнатной температуре.

От начала способа в день 0 до начала промывания и сбора культуры CD19-CAR-T-клетки культивируют в течение 20-28 часов после высевания. После культивирования суспензию клеток подвергают двум промываниям культивируемого материала и одному промыванию собранного материала в камере CentriCult (Miltenyi Biotech).

После промывания собранного материала на CliniMACS® Prodigy® в день 1 из суспензии клеток отбирают образцы для определения числа и жизнеспособности жизнеспособных клеток. Суспензию клеток затем переносят в центрифугу для осаждения вручную. Надосадочную жидкость удаляют, и клеточный осадок ресуспендируют в CS10

(BioLife Solution), что приводит к получению состава на основе продукта при конечной концентрации DMSO, составляющей ~ 10,0%. Число жизнеспособных клеток составляют в конце сбора для введения дозы. Дозы затем распределяют в отдельные мешки для криоконсервации, и отбор аналитических образцов осуществляют в криофлаконы.

Криоконсервированные продукты хранятся в контролируемых резервуарах для хранения с LN2 в безопасной зоне с ограниченным доступом до окончательного выпуска и транспортировки.

В некоторых вариантах осуществления IL-2, используемый в среде на основе OpTmizer™ CTS™, может быть заменен на IL-15, hetIL-15 (IL-15/sIL-15Ra), IL-6 или IL-6/sIL-6Ra.

Пример 16. Активация CAR-T-клеток с помощью полиспецифических связывающих молекул

Получали разнообразные конфигурации биспецифических антител и их мультимерных конъюгатов. Схема таких конъюгатов представлена на **фиг. 51A-51B** (конструкции 1-17, также называемые F1-F17).

Для определения характеристик активации и лентивирусной трансдукции Т-клеток Т-клетки высевали при различных концентрациях в 96-луночный планшет в среду с добавками. Реагенты, содержащие конструкции 1-17 на **фиг. 51A-51B** при различных концентрациях, применяли для стимуляции Т-клеток в течение 30 минут. TransAct от Miltenyi при оптимальной подобранной концентрации применяли в качестве положительного контроля. Стимулированные Т-клетки затем обрабатывали лентивирусом, содержащим вектор, кодирующий CAR для CD19, при MOI, обеспечивающей целевую 20% трансдукцию. После культивирования клеток 75% культуры извлекали для анализа методом FACS. Оставшиеся 25% культивировали и анализировали с помощью FACS еще раз. Клетки анализировали с помощью визуализации на Celigo, анализа уровней IFN-гамма и IL-2 в надосадочной жидкости и FACS для оценки успешной трансдукции CAR для CD19. **На фиг. 52** показано полученное в результате образование кластеров Т-клеток.

Пример 17. Определение характеристик CAR-T-клеток, активированных с помощью полиспецифических связывающих молекул

Т-клетки, выделенные от трех разных доноров, высевали в 96-луночный планшет в среду с добавками. Реагенты, содержащие конструкции 1-17 на **фиг. 51A-51B** при различных концентрациях, применяли для стимуляции Т-клеток. TransAct от Miltenyi при оптимальной подобранной концентрации применяли в качестве положительного контроля. Стимулированные Т-клетки затем обрабатывали лентивирусом, содержащим вектор, кодирующий CAR для CD19, при MOI, обеспечивающей целевую 20% трансдукцию. Надосадочные жидкости удаляли через 24 часа после стимуляции для анализа на Meso Scale Discovery (MSD). Для измерения экспрессии CAR клетки отбирали через 3,5 дня после добавления вируса. Клетки анализировали с помощью визуализации на Celigo, 10-плексного анализа уровней цитокинов в надосадочной жидкости и FACS для

оценки успешной трансдукции CAR для CD19.

Для большинства конструкций наблюдалась более чем 70% жизнеспособность клеток, хотя форматы 1 и 10 демонстрировали сниженную жизнеспособность при некоторых условиях. Конструкции 1-5, 7, 12, 13, 15 и 16 демонстрировали более чем 20% трансдукцию CAR, усредненную для трех доноров (**фиг. 54**). Мультимерные конструкции демонстрировали колоколообразную картину трансдукции. Сниженная трансдукция наблюдалась для Т-клеток, стимулированных конструкциями, направленными только на CD3 - конструкциями 14 и 17. Данные MSD дня 1 представлены на **фиг. 53**.

Пример 18. Оценка in vitro CAR-Т-клеток, изготовленных с применением полиспецифических связывающих молекул

Т-клетки активировали с помощью реагентов, содержащих конструкции 1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 13, 15, 16 или TransAct, при различных концентрациях и трансдуцировали лентивирусом, содержащим вектор, кодирующий CAR для CD19, при MOI, обеспечивающей целевую 20% трансдукцию в течение 24 часов. Клетки промывали, фенотипировали и замораживали. Т-клетки затем размораживали и оценивали в отношении выхода и жизнеспособности в тот же самый день после размораживания. После размораживания Т-клетки анализировали в отношении фенотипа и трансдукции CAR, и получали профили цитокинов и считываемые показатели анализа уничтожения с Nalm6 WT и Nalm6 CD19 KO.

В одном исследовании клетки промывали, и половину клеток отбирали для окрашивания для проточной цитометрии, а половину клеток высевали обратно и инкубировали в течение 3 дней. Клетки окрашивали на четвертый день для выявления экспрессии CAR. В других исследованиях клетки размораживали позже и высевали с трансдуцированными люциферазой клетками-мишенями при соотношениях CAR-Т-клетки:клетки-мишени, составляющих от 0,6:1 до 5:1, на 24 часа. Для исследования, показанного на фиг. 57A-57B, использовали соотношение CAR-Т-клетки:клетки-мишени, составляющее 2,5:1. Через 24 часа измеряли сигнал люциферазы в качестве косвенного показателя целевой жизнеспособности клеток. Его использовали для расчета эффективной способности CAR-Т-клеток к уничтожению.

Как показано на **фиг. 55**, F1, F3, F5 и F4, все из которых имеют валентность по отношению к лигандам, составляющую 2, демонстрировали более высокую активность, чем мультимерные конструкции. Конструкции, нацеливающиеся на CD2, демонстрировали повышенную трансдукцию в концентрациях, охватывающих от 0,1 до 10 мкг/мл. **Фиг. 56A-56D** дополнительно демонстрируют, что полученные в результате CAR-Т-клетки проявляют специфическое уничтожение CD19+ клеток. Согласно **фиг. 57A-57B** полученные в результате CAR-Т-клетки также секретируют цитокины антигенспецифическим образом.

Пример 19. Оценка in vivo CAR-Т-клеток, изготовленных с применением полиспецифических связывающих молекул

Т-клетки от двух доноров активировали с помощью реагентов, содержащих

конструкции 3 и 4 или TransAct, и трансдуцировали лентивирусом, содержащим вектор, кодирующий CAR, при MOI. составляющей 1, обеспечивающей целевую 20% трансдукцию в течение 24 часов. Клетки промывали, фенотипировали, оценивали в отношении продуцирования цитокинов и замораживали. Т-клетки затем размораживали и оценивали в отношении выхода и жизнеспособности в тот же самый день после размораживания. После размораживания Т-клетки культивировали в течение 3 дополнительных дней и анализировали в отношении трансдукции CAR.

Противоопухолевую активность набора CAR-Т-клеток, нацеливающихся на CD19, активированных с помощью конструкций 3, 4 или TransAct, также оценивали in vivo в ксенотрансплантатной модели NALM6.

Подробности модели и протокола представлены ниже.

Линия клеток - Nalm6 (RRID: CVCL_0092) представляет собой линию клеток острого лимфобластного лейкоза (ALL) человека. Клетки выращивали в среде RPMI, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку в суспензии. Эти клетки персистируют и размножаются у мышей при внутривенной имплантации. Клетки модифицировали таким образом, чтобы они экспрессировали люциферазу, так что рост опухолевых клеток можно также отслеживать путем визуализации мышей после того, как им был инъецирован субстрат люциферин.

Мыши - NSG возрастом 6 недель (NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ) получали от Jackson Laboratory.

Протокол - клетки Nalm6 инъецировали мышам. Клетки Nalm6 эндогенно экспрессируют CD19 и, таким образом, применяются для тестирования эффективности CAR-Т-клеток, направленных на CD19, in vivo.

После имплантации опухоли мышам вводили дозы CAR-Т-клеток для обработки Nalm6. CART инъецировали мышам. Пять мышей на группу получали обработку с помощью PBS в отдельности (PBS), нетрансдуцированных Т-клеток, обработанных с помощью инициаторов TransAct, F3 или F4, или CAR-Т-клеток, изготовленных с применением F3, F4 или TransAct. Все клетки получали параллельно.

Состояние здоровья мышей отслеживали ежедневно, в том числе дважды в неделю измеряли массу тела. Процентное изменение массы тела рассчитывали как (BW текущая - BW исходная)/(BW исходная) x 100%. Опухоли отслеживали 2 раза в неделю путем визуализации мышей.

Как показано на **фиг. 58**, полученные в результате CD19-CAR-Т-клетки были способны обеспечивать очищение от высоких опухолевых нагрузок in vivo и были сравнимы с TransAct в случае с обеими из конструкций 3 (F3) и 4 (F4). Было также обнаружено, что CD19-CAR-Т-клетки, полученные с помощью конструкций 3 (F3) и 4 (F4), проходят размножение in vivo (**фиг. 59**).

В одном исследовании криоконсервированные донорские клетки размораживали в среде OpTmizer и высевали. Добавляли вектор и стимулирующий реагент и инкубировали в течение 24 часов. Клетки промывали, и 50% клеток криоконсервировали, 25%

окрашивали для проточной цитометрии, а 25% клеток высевали обратно и инкубировали в течение 3 дней. Клетки окрашивали на четвертый день для выявления экспрессии CAR. Криоконсервированную часть клеток размораживали позже в среде и подсчитывали. Затем ее ресуспендировали в PBS и инъецировали мышам с ранее инъецированной опухолью, трансдуцированной люциферазой. Сигнал люциферазы и количество CAR-T-клеток в периферической крови измеряли еженедельно для определения эффективности.

Как показано на **фиг. 60A-60D**, CAR-T-клетки, полученные с использованием конструкций F3 или F4, демонстрировали противоопухолевую активность и размножение in vivo.

Пример 20. Эффективность in vivo CAR-T-клеток, изготовленных с применением shRNA для Tet2

Посредством способов изготовления с размножением или без размножения, описанных в данном документе, получают CAR-T-клетки - с введением или без введения shRNA для Tet2. В некоторых вариантах shRNA Tet2 представлена в том же векторе, что и CAR. В некоторых вариантах shRNA Tet2 и CAR представлены в разных векторах; в этих случаях вектор с shRNA для Tet2 дополнительно содержит выявляемую метку. В некоторых вариантах CAR является CD19-, BCMA-, CD20-, CD22-, CLL-1- или EGFRvIII-специфичным. CAR-T-клетки затем замораживают. CAR-T-клетки размораживают и вводят мышам в модели TMD8. Мышей измеряют и взвешивают дважды в неделю после имплантации опухоли. Образцы плазмы крови мышей анализируют с помощью FACS. Костный мозг, селезенку и опухоль собирают для фенотипирования Т-клеток, и измеряют продуцирование цитокинов. Было обнаружено, что CAR-T-клетки, изготовленные с применением shRNA для Tet2, характеризуются лучшим противоопухолевым эффектом и пролиферацией по сравнению с контролями.

Пример 21. Усиление трансдукции

Посредством способа изготовления без размножения, описанного в данном документе, и дополнительного добавления вектофусина-1, F108 или LentiBOOST в ходе трансдукции CAR-T-клетки получали и анализировали в отношении % трансдукции при различных концентрациях и в различные моменты времени. Было обнаружено, что F108 усиливает лентивирусную трансдукцию. Дополнительные реагенты F68, F127, протаминсульфат и полибрен тестируют в том же самом способе. В некоторых вариантах CAR, закодированный в векторе для трансдукции, является CD19-, BCMA-, CD20-, CD22-, CLL-1- или EGFRvIII-специфичным.

Пример 22. Стимулирующие конструкции второго поколения

В данном примере описано определение характеристик стимулирующих конструкций второго поколения. Как показано на фиг. 61A, конструкции получали для тестирования связывающих средств, нацеливающихся на различные костимулирующие молекулы (например, CD25, IL6Rb, CD27, 41BB, ICOS или CD2). Кроме того, также сравнивали различные CD3-связывающие средства (связывающие средства на основе антитела к CD3 (1) или антитела к CD3 (2)). Все стимулирующие конструкции второго

поколения имеют конфигурацию, показанную на фиг. 61B. Последовательности различных связывающих средств, тестируемых в данном примере, можно найти в таблице 27.

В одном исследовании конструкции второго поколения сравнивали в отношении эффективности трансдукции. TransAct применяли в качестве контроля. Вкратце, криоконсервированные донорские клетки размораживали в среде OpTmizer и высевали. Добавляли вектор и стимулирующий реагент и инкубировали в течение 24 часов. Клетки промывали, и 50% клеток отбирали для окрашивания для проточной цитометрии, а 50% клеток высевали обратно и инкубировали в течение 3 дней. Клетки окрашивали на четвертый день для выявления экспрессии CAR.

Как показано на фиг. 62, F5 для ICOS был высокоэффективным при 0,01 мкг/мл, и его эффективность трансдукции уменьшалась при увеличении концентрации F5 для ICOS. F5 (конструкция с CD3-связывающим средством на основе антитела к CD3 (1)) была более сильной, чем F5 на основе антитела к CD3 (2) (конструкция с CD3-связывающим средством на основе антитела к CD3 (2)).

Пример 23. Стимулирующие конструкции третьего поколения

Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что снижение связывания стимулирующих конструкций с FcR может приводить к уменьшению или предотвращению нежелательного уничтожения клеток, экспрессирующих FcR, T-клетками. Стимулирующие конструкции третьего поколения получали посредством введения замен D265A/N297A/P329A (нумерация EU в соответствии с Kabat) ("DANAPA") в Fc-область IgG1 стимулирующих конструкций. Кроме того, также сравнивали различные CD3-связывающие средства (связывающие средства на основе антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2) или антитела к CD3 (3)) и различные CD28-связывающие средства (связывающие средства на основе антитела к CD28 (1) или антитела к CD28 (2)) (фиг. 63A). Все стимулирующие конструкции третьего поколения имеют конфигурацию, показанную на фиг. 63B. Последовательности различных связывающих средств, тестируемых в данном примере, можно найти в таблице 27.

В одном исследовании конструкции третьего поколения сравнивали в отношении эффективности трансдукции. Вкратце, криоконсервированные донорские клетки размораживали в среде OpTmizer и высевали. Добавляли вектор и стимулирующий реагент и инкубировали в течение 24 часов. Клетки промывали, и 50% клеток отбирали для окрашивания для проточной цитометрии, а 50% клеток высевали обратно и инкубировали в течение 3 дней. Клетки окрашивали на четвертый день для выявления экспрессии CAR.

Как показано на фиг. 64, все тестируемые конструкции на основе антител к CD3/CD28 или антител к CD3/CD2 способствовали трансдукции CAR.

В другом исследовании конструкции третьего поколения сравнивали в отношении специфического и неспецифического уничтожения. Вкратце, криоконсервированные донорские клетки размораживали в среде OpTmizer и высевали. Добавляли вектор и

стимулирующие реагенты и инкубировали в течение 24 часов. Клетки промывали, и 50% клеток криоконсервировали, 25% клеток окрашивали для проточной цитометрии, а 25% клеток высевали обратно и инкубировали в течение 3 дней. Клетки окрашивали на четвертый день для выявления экспрессии CAR. Криоконсервированные клетки размораживали позже и высевали с трансдуцированными люциферазой опухолевыми клетками-мишенями и опухолевыми клетками, отличными от мишеней, при соотношениях CAR-T-клетки:опухолевые клетки, составляющих от 0,6:1 до 5:1, например, 1:5, на 24 часа. Через 24 часа измеряли сигнал люциферазы в качестве косвенного показателя целевой жизнеспособности клеток. Его использовали для расчета способности CAR-T-клеток к специфическому и неспецифическому уничтожению.

Подвергнутые сайленсингу F3 и F4 (F3 и F4 с заменами DANAPA в Fc-области) - NEG2042 и NEG2043 - демонстрировали эквивалентное уничтожение клеток-мишеней (фиг. 65A), но не демонстрировали неспецифическое уничтожение клеток, отличных от мишеней (фиг. 65B). В отличие от этого, F3 и F4 с Fc-областью дикого типа демонстрировали неспецифическое уничтожение клеток, экспрессирующих FcγR (фиг. 65B).

В другом исследовании конструкцию NEG2043 третьего поколения использовали для получения клеток, экспрессирующих два CAR. В первом исследовании криоконсервированные донорские Т-клетки размораживали в среде OpTmizer и совместно инкубировали в течение 24 часов со стимулирующим реагентом и двумя векторами: первым вектором, кодирующим CAR, нацеливающийся на CD19, и вторым вектором, кодирующим CAR, нацеливающийся на BCMA. Через 24 часа клетки промывали; 50% клеток окрашивали для проточной цитометрии, и 50% клеток повторно высевали и инкубировали в течение дополнительных 3 дней. Клетки окрашивали для выявления экспрессии CAR на четвертый день. Во втором исследовании криоконсервированный донорский продукт лейкафереза размораживали, промывали и обогащали Т-клетками с использованием CliniMACS Prodigy. Обогащенные клетки элюировали в среду OpTmizer. Обогащенные клетки совместно инкубировали в течение 24 часов со стимулирующим реагентом и вектором, кодирующим как CAR, нацеливающийся на CD19, так и CAR, нацеливающийся на CD22. Через 24 часа клетки промывали; 50% клеток окрашивали для проточной цитометрии, и 50% клеток повторно высевали и инкубировали в течение дополнительных 3-6 дней. Клетки окрашивали для выявления экспрессии CAR на четвертый и седьмой дни.

F4 и подвергнутый сайленсингу формат F4 (NEG2043) были способны экспрессировать один или оба CAR при (1) котрансдукции Т-клеток двумя векторами, кодирующими CAR, или (2) их трансдукции одним вектором, кодирующим два CAR. На фиг. 66A показана котрансдукция первого вектора, кодирующего CAR, нацеливающийся на CD19, и второго вектора, кодирующего CAR, нацеливающийся на BCMA. На фиг. 66B показана трансдукция одного вектора, кодирующего как CAR, нацеливающийся на CD19, так и CAR, нацеливающийся на CD22.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Раскрытия всех без исключения патентов, заявок на патент и публикаций, цитируемых в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Несмотря на то, что настоящее изобретение было раскрыто со ссылкой на определенные варианты осуществления, очевидно, что дополнительные варианты осуществления и видоизменения настоящего изобретения могут быть разработаны другими специалистами в данной области без отступления от фактической сущности и объема настоящего изобретения. Предполагается, что прилагаемую формулу изобретения следует истолковывать как включающую все такие варианты осуществления и эквивалентные видоизменения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), при этом способ включает:

(i) приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта лейкафереза) в контакт (например, связывание) с полиспецифической связывающей молекулой, содержащей (A) домен, связывающий CD3, и (B) домен, связывающий костимулирующую молекулу (например, домен, связывающий CD2, или домен, связывающий CD28);

(ii) приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей CAR, за счет чего обеспечивается получение популяции клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и

(iii) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторного составления популяции клеток в среде для криоконсервации) или введения, где:

(a) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и

стадию (iii) проводят не позже чем через 30 (например, 26) часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (i),

(b) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и

стадию (iii) проводят не позже чем через 30 часов после начала стадии (ii), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 часов после начала стадии (ii), или

(c) популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i),

где молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) необязательно находится в вирусном векторе, где молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) необязательно представляет собой молекулу РНК в вирусном векторе, где стадия (ii) необязательно включает трансдукцию популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR.

2. Способ по п. 1, где:

домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, расположен с N-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, например, Fab для CD2 или Fab для CD28; или

домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, расположен с С-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, например, Fab для CD2 или Fab для CD28, где необязательно:

между доменом, связывающим CD3, и доменом, связывающим костимулирующую молекулу, расположена Fc-область; или

полиспецифическая связывающая молекула содержит CH2, и домен, связывающий CD3, расположен с N-концевой стороны от CH2.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) первый полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VH домена, связывающего CD3, VL домена, связывающего CD3, VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, CH2 и CH3; и

(ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL.

4. Способ по п. 1 или п. 2, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) первый полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, CH2, CH3, VH домена, связывающего CD3, и VL домена, связывающего CD3; и

(ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL.

5. Способ по п. 1 или п. 2, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) первый полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, VH домена, связывающего CD3, VL домена, связывающего CD3, CH2 и CH3; и

(ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к С-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где домен, связывающий CD3, содержит scFv, и домен, связывающий костимулирующую молекулу, является частью Fab-фрагмента.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где домен, связывающий CD3, содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, из молекулы антитела к CD3 из таблицы 27 (например, антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2), антитела к CD3 (3) или антитела к CD3 (4)); и/или

(ii) аминокислотную последовательность любой из VH- и/или VL-областей молекулы антитела к CD3, представленной в таблице 27 (например, антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2), антитела к CD3 (3) или антитела к CD3 (4)), или аминокислотную

последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную ей.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где домен, связывающий костимулирующую молекулу, представляет собой домен, связывающий CD2, где необязательно домен, связывающий CD2, содержит:

(i) VH, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и VL, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, из молекулы антитела к CD2 из таблицы 27 (например, антитела к CD2 (1)); и/или

(ii) аминокислотную последовательность любой из VH- и/или VL-областей молекулы антитела к CD2, представленной в таблице 27 (например, антитела к CD2 (1)), или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную ей.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где домен, связывающий костимулирующую молекулу, представляет собой домен, связывающий CD28, где необязательно домен, связывающий CD28, содержит:

(i) VH, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и VL, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, из молекулы антитела к CD28 из таблицы 27 (например, антитела к CD28 (1) или антитела к CD28 (2)); и/или

(ii) аминокислотную последовательность любой из VH- и/или VL-областей молекулы антитела к CD28, представленной в таблице 27 (например, антитела к CD28 (1) или антитела к CD28 (2)), или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную ей.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где домен, связывающий CD3, содержит:

(i) scFv;

(ii) VH, связанную с VL с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера $(G_4S)_4$; или

(iii) VH и VL, где VH расположена с N-концевой стороны от VL.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где домен, связывающий костимулирующую молекулу, является частью Fab-фрагмента, например, Fab-фрагмента, который является частью полипептидной последовательности, содержащей Fc-домен, где необязательно Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 28, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью Fc-домена, представленной в таблице 28.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где домен, связывающий CD3, расположен с N-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, где необязательно домен, связывающий CD3, связан с доменом, связывающим костимулирующую молекулу, с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера $(G_4S)_4$.

13. Способ по любому из пп. 1-11, где домен, связывающий CD3, расположен с C-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу.

14. Способ по п. 13, где:

(i) между доменом, связывающим CD3, и доменом, связывающим костимулирующую молекулу, расположена Fc-область; и/или

(ii) полиспецифическая связывающая молекула содержит один или оба из CH2 и CH3, где необязательно домен, связывающий CD3, связан с CH3 с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера $(G_4S)_4$.

15. Способ по п. 13, где:

(i) полиспецифическая связывающая молекула содержит CH2, и домен, связывающий CD3, расположен с N-концевой стороны от CH2;

(ii) домен, связывающий CD3, связан с CH1 с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера $(G_4S)_2$; и/или

(iii) домен, связывающий CD3, связан с CH2 с помощью пептидного линкера, например, глицин-серинового линкера, например, линкера $(G_4S)_4$.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) аминокислотную последовательность любой тяжелой цепи, представленной в таблице 28, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; и/или

(ii) аминокислотную последовательность любой легкой цепи, представленной в таблице 28, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где стадия (i) обеспечивает увеличение процентной доли клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii), например, популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более высокую процентную долю клеток, экспрессирующих CAR (например, на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50 или 60% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа без стадии (i).

18. Способ по любому из пп. 1-17, где:

(a) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является такой же, как процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от нее на не более чем 5 или 10%;

(b) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) увеличена, например, в по меньшей мере 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 или 3 раза по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (i);

(c) процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток увеличивается в ходе стадии (ii), например, увеличивается, например, на по меньшей мере

30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%, в течение 18-24 часов после начала стадии (ii); или

(d) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) не уменьшается или уменьшается на не более чем 5 или 10% по сравнению с процентной долей необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале стадии (i).

19. Способ по любому из пп. 1-18, где:

(a) популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(b) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой (например, в по меньшей мере 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 или 3 раза выше), чем процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(c) процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой (например, в по меньшей мере 4, 6, 8, 10 или 12 раз выше), чем процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(d) популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более высокую процентную долю необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% выше), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(e) процентная доля необученных клеток, например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой (например, в по меньшей мере 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 или 3 раза выше), чем процентная доля необученных клеток, например, необученных

Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней; или

(f) процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой (например, в по меньшей мере 4, 6, 8, 10 или 12 раз выше), чем процентная доля необученных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где:

(a) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток из стадии (iii) является такой же, как процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти, в популяции клеток в начале стадии (i) или отличается от нее на не более чем 5 или 10%;

(b) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является уменьшенной на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток в начале стадии (i);

(c) процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ клеток, экспрессирующих CAR, уменьшается в ходе стадии (ii), например, уменьшается, например, на по меньшей мере 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20% в течение 18-24 часов после начала стадии (ii); или

(d) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) не является увеличенной или является увеличенной на не более чем 5 или 10% по сравнению с процентной долей центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток в начале стадии (i).

21. Способ по любому из пп. 1-20, где:

(a) популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более низкую процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% ниже), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(b) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток

памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более низкой (например, на по меньшей мере 20, 30, 40 или 50% ниже), чем процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(c) процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более низкой (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% ниже), чем процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(d) популяция клеток из стадии (iii) демонстрирует более низкую процентную долю центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CD95+ центральных Т-клеток памяти (например, на по меньшей мере 10, 20, 25, 30 или 40% ниже), по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(e) процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более низкой (например, на по меньшей мере 20, 30, 40 или 50% ниже), чем процентная доля центральных клеток памяти, например, центральных Т-клеток памяти, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней; или

(f) процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более низкой (например, на по меньшей мере 10, 20, 30 или 40% ниже), чем процентная доля центральных Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CCR7+ CD45RO+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где:

(a) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+

рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является увеличенной по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток в начале стадии (i);

(b) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является увеличенной по сравнению с процентной долей стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток в начале стадии (i);

(c) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i); или

(d) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i);

(e) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней; или

(f) процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, в популяции клеток из стадии (iii) является более высокой, чем процентная доля стволовых Т-клеток памяти, экспрессирующих CAR, например, CD45RA+ CD95+ рецептор IL-2 β+ CCR7+ CD62L+ Т-клеток, экспрессирующих CAR, среди клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где:

(a) медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 75, 100 или 125%;

(b) медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 100, 150, 200, 250 или 300% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(c) медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150 или 200%;

(d) медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 50, 100, 125, 150 или 175% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(e) медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 25, 50, 100, 150, 200 или 250%;

(f) медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для

популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 50, 100 или 125% ниже), чем медианный балл набора генов (подавляемые в состоянии стволовости) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(g) медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 125, 150, 175 или 200%;

(h) медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 40, 50, 60, 70 или 80% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые при гипоксии) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней;

(j) медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток из стадии (iii) является приблизительно таким же, как медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток в начале стадии (i), или отличается от него на не более чем (например, увеличен на не более чем) приблизительно 180, 190, 200 или 210%; или

(k) медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для популяции клеток из стадии (iii) является более низким (например, на по меньшей мере приблизительно 20, 30 или 40% ниже), чем медианный балл набора генов (активируемые при аутофагии) для:

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или

клеток, полученных посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции

клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где популяция клеток из стадии (iii) после инкубирования с клеткой, экспрессирующей антиген, распознаваемый CAR, секретирует IL-2 на более высоком уровне (например, в по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12 или 14 раз более высоком), чем клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней, например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 8 в отношении фиг. 29C-29D.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где популяция клеток из стадии (iii) после введения in vivo персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, согласно оценке с применением способов, описанных в примере 1 в отношении фиг. 4C) по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или по сравнению с клетками, полученными посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где популяция клеток из стадии (iii) после введения in vivo демонстрирует более сильную противоопухолевую активность (например, более сильную противоопухолевую активность при низкой дозе, например, дозе, составляющей не более $0{,}15\times10^6$, $0{,}2\times10^6$, $0{,}25\times10^6$ или $0{,}3\times10^6$ жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR), чем клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, в котором стадию (iii) проводят через более чем 26 часов после начала стадии (i), например, через более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней после начала стадии (i), или клетки, полученные посредством в остальном аналогичного способа, который дополнительно включает после стадии (ii) и перед стадией (iii) размножение популяции клеток (например, Т-клеток) in vitro в течение более чем 3 дней, например, в течение 5, 6, 7, 8 или 9 дней.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся с увеличением численности на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i), где необязательно количество живых клеток в популяции клеток из стадии (iii) является уменьшенным по сравнению с количеством живых клеток в популяции клеток в

начале стадии (i).

28. Способ по любому из пп. 1-27, где популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся за менее чем 2 часа, например, менее чем 1 или 1,5 часа, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i).

29. Способ по любому из пп. 1-28, где стадии (i) и/или (ii) проводят в средах для клеток (например, бессывороточных средах), содержащих IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-7, IL-21, IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra), ингибитор LSD1, ингибитор MALT1 или их комбинацию.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где стадии (i) и/или (ii) проводят в бессывороточных средах для клеток, содержащих заменитель сыворотки.

31. Способ по п. 30, где заменитель сыворотки представляет собой заменитель сыворотки для иммунных клеток (ICSR) CTS™.

32. Способ по любому из пп. 1-31, дополнительно включающий перед стадией (i):

(iv) (необязательно) получение свежего продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как свежий продукт, представляющий собой цельную кровь, свежий продукт, представляющий собой костный мозг, или свежий продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, свежий продукт, полученный в результате тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения, и

(v) выделение популяции клеток (например, Т-клеток, например, CD8+ и/или CD4+ Т-клеток), приводимых в контакт на стадии (i), из свежего продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как свежий продукт, представляющий собой цельную кровь, свежий продукт, представляющий собой костный мозг, или свежий продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, свежий продукт, полученный в результате тимэктомии)), где необязательно:

стадию (iii) проводят не позже чем через 35 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 30 часов после начала стадии (v), или

популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в конце стадии (v).

33. Способ по любому из пп. 1-31, дополнительно включающий перед стадией (i) получение криоконсервированных Т-клеток, выделенных из продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, как, например, криоконсервированных Т-клеток, выделенных из цельной крови, костного мозга или продукта, полученного в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения.

34. Способ по любому из пп. 1-31, дополнительно включающий перед стадией (i):

(iv) (необязательно) получение криоконсервированного продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как криоконсервированный продукт, представляющий собой цельную кровь, криоконсервированный продукт, представляющий собой костный мозг, или криоконсервированный продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, криоконсервированный продукт, полученный в результате тимэктомии)), от организации, например, лаборатории, больницы или учреждения здравоохранения, и

(v) выделение популяции клеток (например, Т-клеток, например, CD8+ и/или CD4+ Т-клеток), приводимых в контакт на стадии (i), из криоконсервированного продукта лейкафереза (или альтернативного источника гемопоэтической ткани, такого как криоконсервированный продукт, представляющий собой цельную кровь, криоконсервированный продукт, представляющий собой костный мозг, или криоконсервированный продукт, полученный в результате биопсии или удаления опухоли или органа (например, криоконсервированный продукт, полученный в результате тимэктомии)), где необязательно:

стадию (iii) проводят не позже чем через 35 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 часов после начала стадии (v), например, не позже чем через 30 часов после начала стадии (v), или

популяция клеток из стадии (iii) не является размножившейся или является размножившейся на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, на не более чем 10%, например, согласно оценке по количеству живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в конце стадии (v).

35. Способ по любому из пп. 1-34, дополнительно включающий стадию (vi):

культивирование части популяции клеток из стадии (iii) в течение по меньшей мере 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 или 7 дней, например, в течение по меньшей мере 2 дней и не более 7 дней, и измерение уровня экспрессии CAR в этой части (например, измерение процентной доли жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, в этой части), где необязательно:

стадия (iii) включает сбор и замораживание популяции клеток (например, Т-клеток), и стадия (vi) включает размораживание части популяции клеток из стадии (iii), культивирование этой части в течение по меньшей мере 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 или 7 дней, например, в течение по меньшей мере 2 дней и не более 7 дней, и измерение уровня экспрессии CAR в этой части (например, измерение процентной доли жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, в этой части).

36. Способ по любому из пп. 1-35, где стадия (ii) дополнительно включает добавление F108 в ходе трансдукции и/или приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с shRNA, которая целенаправленно воздействует на Tet2.

37. Способ по любому из пп. 1-36, где популяция клеток в начале стадии (i) или стадии (1) была обогащена клетками, экспрессирующими IL6R (например, клетками,

которые являются положительными по IL6Rα и/или IL6Rβ).

38. Способ по любому из пп. 1-37, где популяция клеток в начале стадии (i) или стадии (1) содержит не менее 50, 60 или 70% клеток, экспрессирующих IL6R (например, клеток, которые являются положительными по IL6Rα и/или IL6Rβ).

39. Способ по любому из пп. 1-38, где стадии (i) и (ii) или стадии (1) и (2) проводят в средах для клеток, содержащих IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)).

40. Способ по п. 39, где IL-15 обеспечивает увеличение способности популяции клеток к размножению, например, спустя 10, 15, 20 или 25 дней.

41. Способ по п. 39, где IL-15 обеспечивает увеличение процентной доли клеток, экспрессирующих IL6Rβ, в популяции клеток.

42. Способ по любому из пп. 1-41, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

43. Способ по п. 42, где антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, выбранным из CD19, CD20, CD22, BCMA, мезотелина, EGFRvIII, GD2, Tn-антигена, sTn-антигена, Tn-O-гликопептидов, sTn-O-гликопептидов, PSMA, CD97, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, KIT, IL-13Ra2, легумана, GD3, CD171, IL-11Ra, PSCA, MAD-CT-1, MAD-CT-2, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB (например, ERBB2), Her2/neu, MUC1, EGFR, NCAM, эфрина B2, CAIX, LMP2, sLe, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, FAP, легумаина, E6 или E7 HPV, ML-IAP, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, полисиаловой кислоты, Fos-родственного антигена, эластазы нейтрофилов, TRP-2, CYP1B1, белка спермы 17, бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека, AFP, тиреоглобулина, PLAC1, globoH, RAGE1, MN-CA IX, обратной транскриптазы теломеразы человека, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного варианта hsp 70-2, NA-17, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, NY-ESO-1, GPR20, Ly6k, OR51E2, TARP, GFRα4 или пептида любого из этих антигенов, презентированного на MHC.

44. Способ по п. 42 или п. 43, где антигенсвязывающий домен содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в данном документе, где необязательно:

(a) антигенсвязывающий домен связывается с BCMA и содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в таблицах 3-15, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней;

(b) антигенсвязывающий домен связывается с CD19 и содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в таблице 2, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней;

(c) антигенсвязывающий домен связывается с CD20 и содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в данном документе, или

последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней; или

(d) антигенсвязывающий домен связывается с CD22 и содержит последовательность CDR, VH, VL, scFv или CAR, раскрытую в данном документе, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней.

45. Способ по любому из пп. 42-44, где антигенсвязывающий домен содержит VH и VL, где VH и VL соединены линкером, где необязательно линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 63 или 104.

46. Способ по любому из пп. 42-45, где:

(a) трансмембранный домен включает в себя трансмембранный домен белка, выбранного из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154,

(b) трансмембранный домен включает в себя трансмембранный домен CD8,

(c) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, или

(d) молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранный домен, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 17 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

47. Способ по любому из пп. 42-46, где антигенсвязывающий домен соединен с трансмембранным доменом с помощью шарнирной области, где необязательно:

(a) шарнирная область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 3 или 4 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, или

(b) молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую шарнирную область, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, 14 или 15 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

48. Способ по любому из пп. 42-47, где внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен, где необязательно первичный сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из CD3-дзета, TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a,

CD79b, CD278 (ICOS), FcεRI, DAP10, DAP12 или CD66d, где необязательно:

(a) первичный сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из CD3-дзета,

(b) первичный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; или

(c) молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первичный сигнальный домен, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 20 или 21 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

49. Способ по любому из пп. 42-48, где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен, где необязательно костимулирующий сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из молекулы MHC I класса, белкового рецептора TNF, иммуноглобулиноподобного белка, рецептора цитокина, интегрина, сигнальной молекулы активации лимфоцитов (белка SLAM), активирующего рецептора NK-клеток, BTLA, лиганда Toll-подобного рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, 4-1BB (CD137), B7-H3, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD28-OX40, CD28-4-1BB или лиганда, который специфично связывается с CD83, где необязательно:

(a) костимулирующий сигнальный домен включает в себя функциональный сигнальный домен, полученный из 4-1BB,

(b) костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, или

(c) молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую костимулирующий сигнальный домен, где последовательность нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 18 или последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по

меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

50. Способ по любому из пп. 42-49, где внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен, полученный из 4-1BB, и функциональный сигнальный домен, полученный из CD3-дзета, где необязательно внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 (или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней) и аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10 (или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней), где необязательно внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10.

51. Способ по любому из пп. 42-50, где CAR дополнительно содержит лидерную последовательность, включающую в себя аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

52. Популяция клеток, экспрессирующих CAR (например, аутологичных или аллогенных Т-клеток или NK-клеток, экспрессирующих CAR), полученная посредством способа по любому из пп. 1-51.

53. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, экспрессирующих CAR, по п. 52 и фармацевтически приемлемый носитель.

54. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту популяции клеток, экспрессирующих CAR, по п. 52 или фармацевтической композиции по п. 53, за счет чего обеспечивается усиление иммунного ответа у субъекта.

55. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту популяции клеток, экспрессирующих CAR, по п. 52 или фармацевтической композиции по п. 53, за счет чего обеспечивается лечение рака у субъекта.

56. Способ по п. 55, где рак представляет собой солидный рак, например, выбранный из одного или нескольких из мезотелиомы, злокачественной мезотелиомы плевры, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака легкого, крупноклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, аденокарциномы пищевода, рака молочной железы, глиобластомы, рака яичника, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака кожи, меланомы, рака почки, рака печени, рака головного мозга, тимомы, саркомы, карциномы, рака матки, рака почки, рака желудочно-кишечного тракта, уротелиального рака, рака глотки, рака головы и шеи, рака прямой кишки, рака пищевода или рака мочевого пузыря или их метастазов.

57. Способ по п. 55, где рак представляет собой гемобластоз, например, выбранный из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), множественной миеломы, острого лимфоидного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, B-

клеточного острого лимфоидного лейкоза (BALL), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (TALL), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (SLL), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), DLBCL, ассоциированной с хроническим воспалением, хронического миелоидного лейкоза, миелопролиферативных новообразований, фолликулярной лимфомы, педиатрической фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы (экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны из лимфоидной ткани слизистых оболочек), лимфомы из клеток маргинальной зоны, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки, лимфомы/лейкоза селезенки, диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки, варианта волосатоклеточного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, болезни тяжелых цепей, плазмоклеточной миеломы, солитарной плазмоцитомы кости, внекостной плазмоцитомы, нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, педиатрической нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, первичной кожной лимфомы из клеток центра фолликула, лимфоматоидного гранулематоза, первичной медиастинальной (тимической) крупноклеточной В-клеточной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ALK+ крупноклеточной В-клеточной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастлемана, первичной выпотной лимфомы, В-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML) или неклассифицируемой лимфомы.

58. Способ по любому из пп. 54-57, дополнительно включающий введение субъекту второго терапевтического средства.

59. Способ по любому из пп. 54-58, где популяцию клеток, экспрессирующих CAR, вводят в дозе, определенной на основании процентной доли клеток, экспрессирующих CAR, измеренной в п. 35.

60. Популяция клеток, экспрессирующих CAR, по п. 52 или фармацевтическая композиция по п. 53 для применения в способе усиления иммунного ответа у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества популяции клеток, экспрессирующих CAR, или эффективного количества фармацевтической композиции.

61. Популяция клеток, экспрессирующих CAR, по п. 52 или фармацевтическая композиция по п. 53 для применения в способе лечения рака у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества популяции клеток, экспрессирующих CAR, или эффективного количества фармацевтической композиции.

62. Молекула антитела, которая связывает CD28, содержащая вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, где:

(i) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 538, 539, 540, 530, 531 и 532 соответственно;

(ii) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 541, 539, 540, 530, 531 и 532 соответственно;

(iii) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 542, 543, 540, 533, 534 и 535 соответственно; или

(iv) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 544, 545, 546, 536, 534 и 532 соответственно.

63. Молекула антитела по п. 62, содержащая:

(i) VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 547 или 548 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 547 или 548;

(ii) VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 537 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней;

(iii) VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 547 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 537 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; или

(iv) VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 548 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 537 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней.

64. Молекула антитела по п. 62 или п. 63, которая представляет собой полноразмерное антитело, биспецифическое антитело, Fab, F(ab')2, Fv или одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv).

65. Молекула антитела по любому из пп. 62-64, содержащая константную область тяжелой цепи, выбранную из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и константную область легкой цепи, выбранную из константных областей легких каппа- или лямбда-цепей.

66. Молекула антитела, которая:

(i) конкурирует за связывание с CD28 с молекулой антитела по любому из пп. 62-65 и/или

(ii) связывается с тем же эпитопом, по существу тем же эпитопом, что и эпитоп

молекулы антитела по любому из пп. 62-65, эпитопом, который перекрывается с ним, или эпитопом, который по существу перекрывается с ним.

67. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу антитела по любому из пп. 62-66.

68. Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая:

(i) домен, связывающий CD3, и

(ii) домен, связывающий CD28, содержащий молекулу антитела по любому из пп. 62-66.

69. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 68, где домен, связывающий CD3, содержит:

(i) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 молекулы антитела к CD3 из таблицы 27 (например, антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2), антитела к CD3 (3) или антитела к CD3 (4)) или

(ii) аминокислотную последовательность любой из VH- и/или VL-областей молекулы антитела к CD3, представленной в таблице 27 (например, антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2), антитела к CD3 (3) или антитела к CD3 (4)), или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную ей.

70. Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая первый связывающий домен и второй связывающий домен, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH первого связывающего домена, VL первого связывающего домена, VH второго связывающего домена, CH1, CH2 и CH3; и

(ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL второго связывающего домена и CL.

71. Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая первый связывающий домен и второй связывающий домен, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH второго связывающего домена, CH1, CH2, CH3, VH первого связывающего домена и VL первого связывающего домена; и

(ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL второго связывающего домена и CL.

72. Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая первый связывающий домен и второй связывающий домен, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH второго связывающего домена, CH1, VH первого связывающего домена, VL первого связывающего домена, CH2 и CH3; и

(ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL второго

связывающего домена и CL.

73. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 70-72, где первый связывающий домен включает в себя домен, связывающий CD3, а второй связывающий домен включает в себя домен, связывающий костимулирующую молекулу.

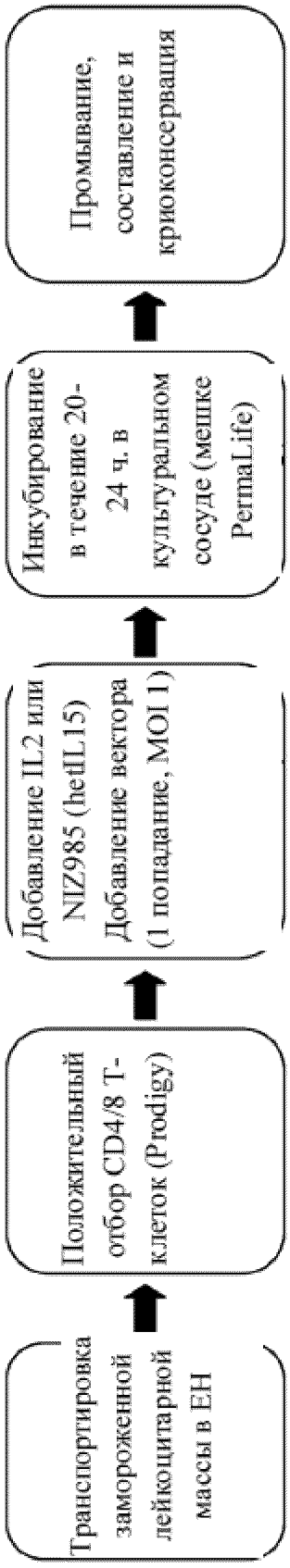
74. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 70-72, где первый связывающий домен включает в себя домен, связывающий костимулирующую молекулу, а второй связывающий домен включает в себя домен, связывающий CD3.

75. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 73 или п. 74, где домен, связывающий костимулирующую молекулу, включает в себя домен, связывающий CD2, или домен, связывающий CD28.

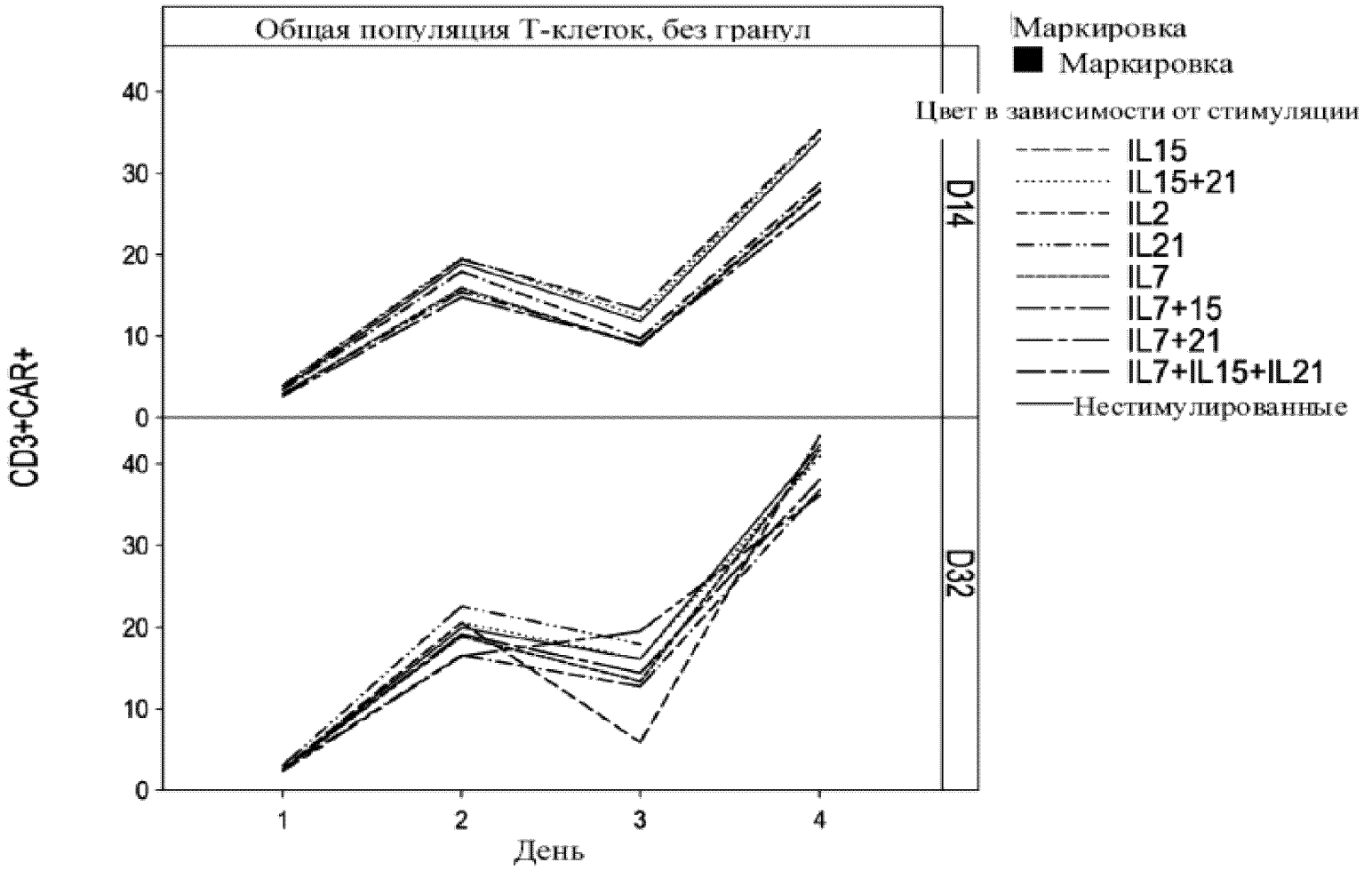
76. Способ активации клеток (например, иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток), включающий приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта лейкафереза) в контакт (например, связывание) с полиспецифической связывающей молекулой по любому из пп. 68-75 или молекулой антитела по любому из пп. 62-66.

77. Способ трансдукции клеток (например, иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток), включающий приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например, Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта лейкафереза) в контакт (например, связывание) с (i) полиспецифической связывающей молекулой по любому из пп. 68-75 или молекулой антитела по любому из пп. 62-66 и (ii) молекулой нуклеиновой кислоты, например, молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR.

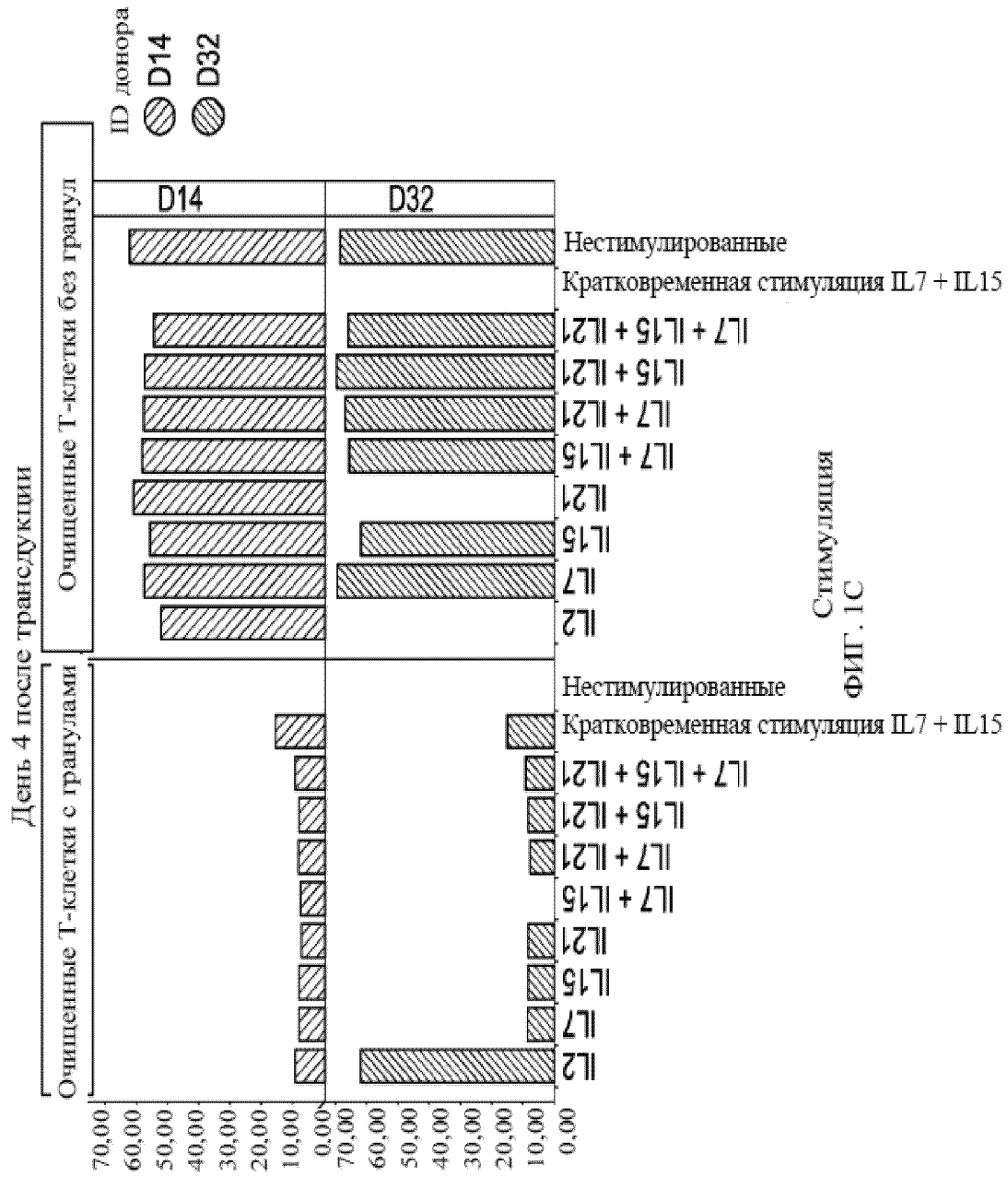
По доверенности


Транспортировка замороженной лейкоцитарной массы в ЕН
Положительный отбор CD4/8 Т-клеток (Prodigy)
Добавление IL2 или NIZ985 (hetIL15) Добавление вектора (1 попадание, MOI 1)
Инкубирование в течение 20-24 ч. в культуральном сосуде (мешке PermaLife)
Промывание, составление и криоконсервация

ФИГ. 1А


Общая популяция Т-клеток, без гранул
CD3+CAR+
40
30
20
10
0
D14
D32
1
2
3
4
День
Маркировка
Маркировка
Цвет в зависимости от стимуляции
IL15
IL15+21
IL2
IL21
IL7
IL7+15
IL7+21
IL7+IL15+IL21
Нестимулированные

ФИГ. 1В

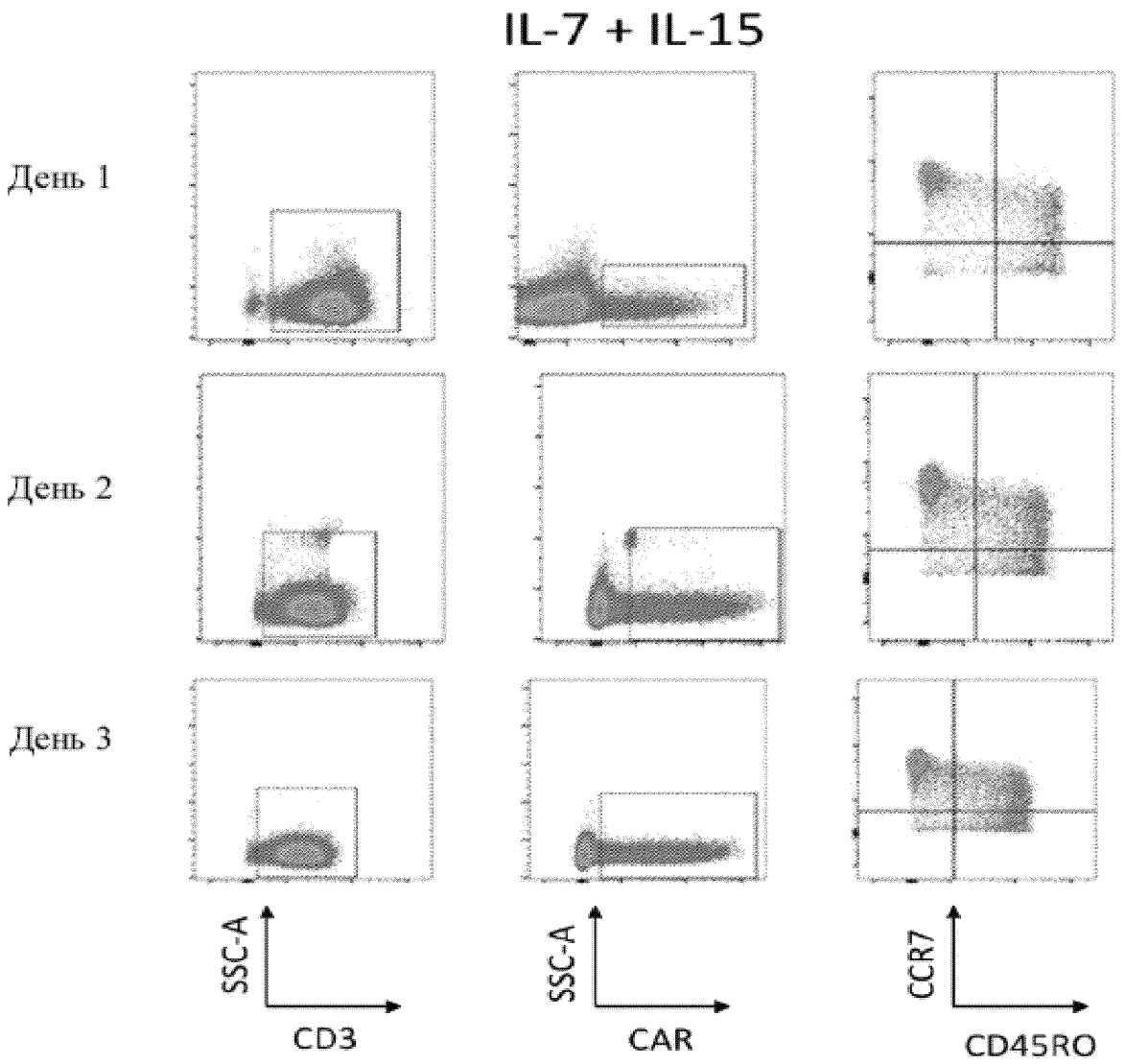

ID донора
D14
D32
День 4 после трансдукции
Очищенные Т-клетки без гранул
Очищенные Т-клетки с гранулами
D14
D32
Нестимулированные
Кратковременная стимуляция IL7 + IL15
IL7 + IL15 + IL21
IL15 + IL21
IL7 + IL21
IL7 + IL15
IL21
IL15
IL7
IL2
Стимуляция
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00

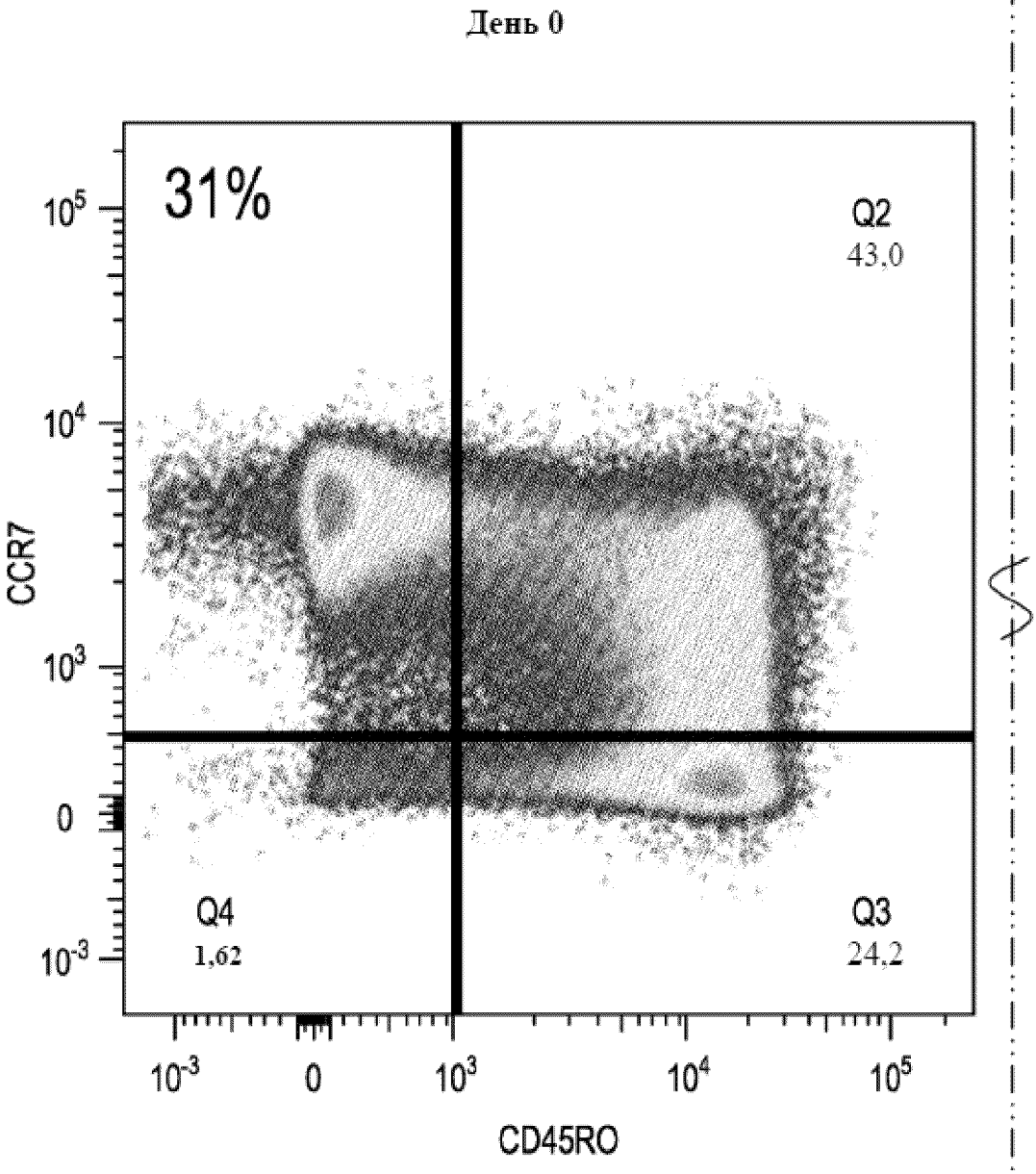
ФИГ. 1С

ФИГ. 1D

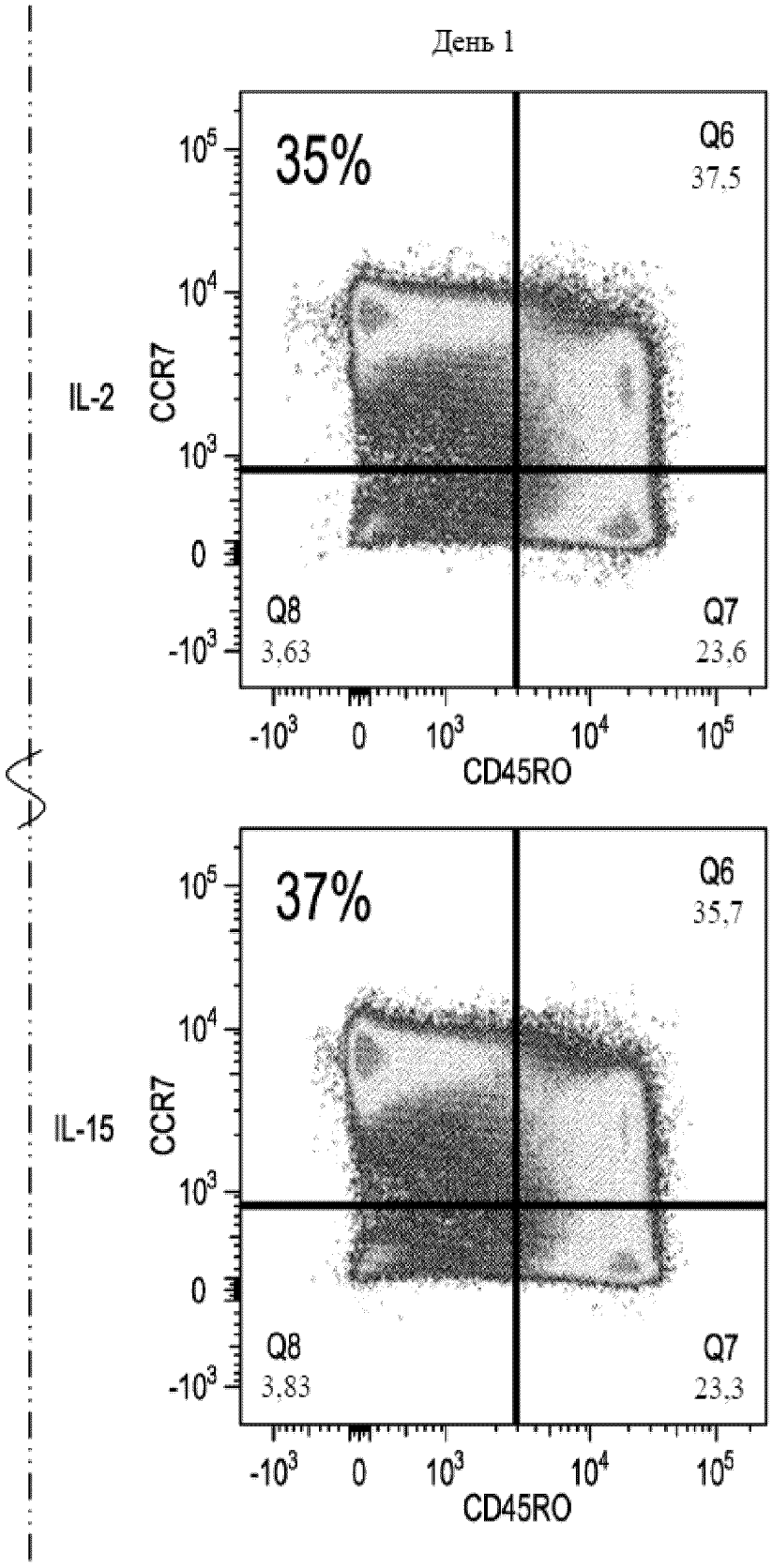
ФИГ. 1E

ФИГ. 1F





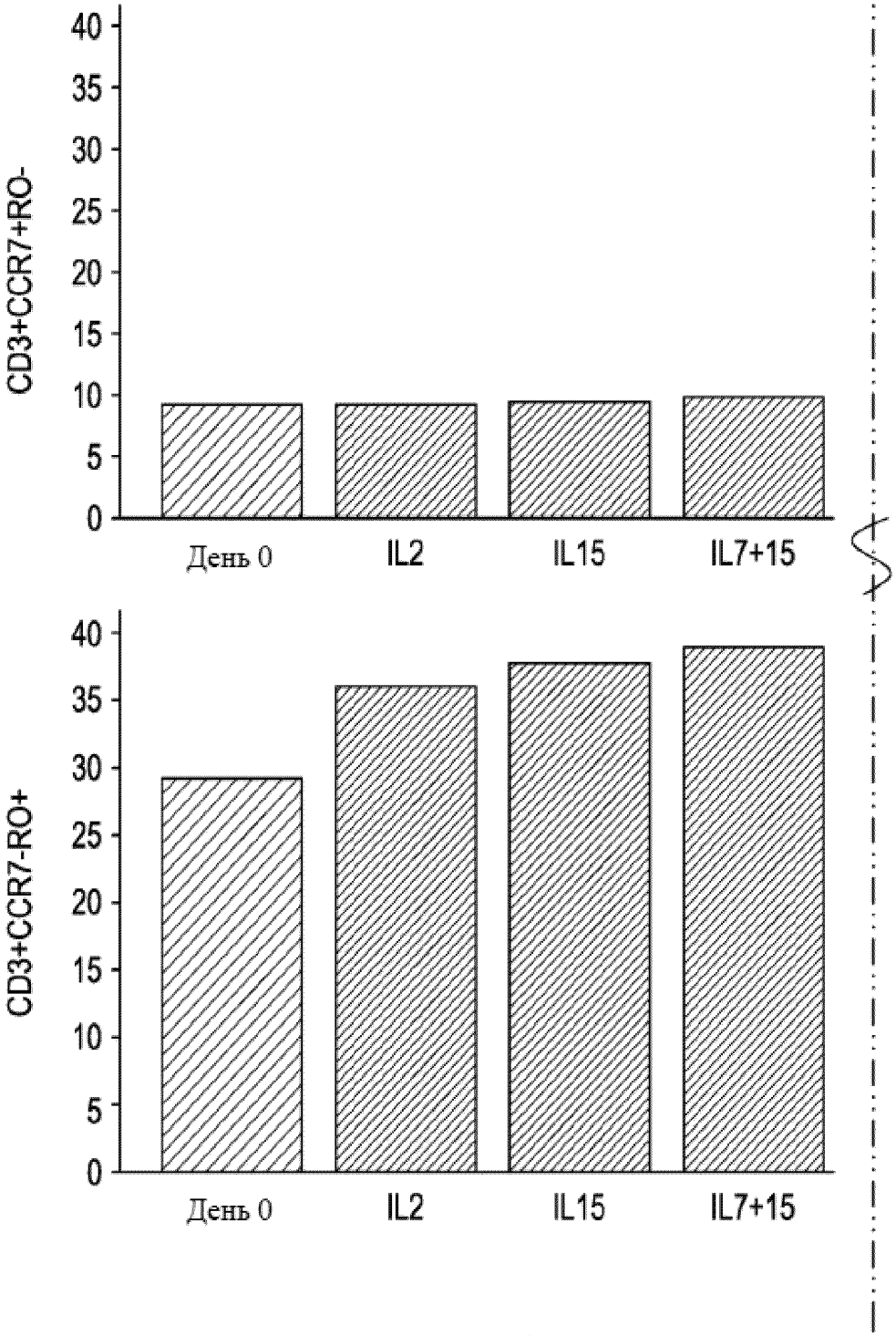
ФИГ. 1G (часть 1)



ФИГ. 1G (часть 2)

Без изменений в фенотипе необученных клеток

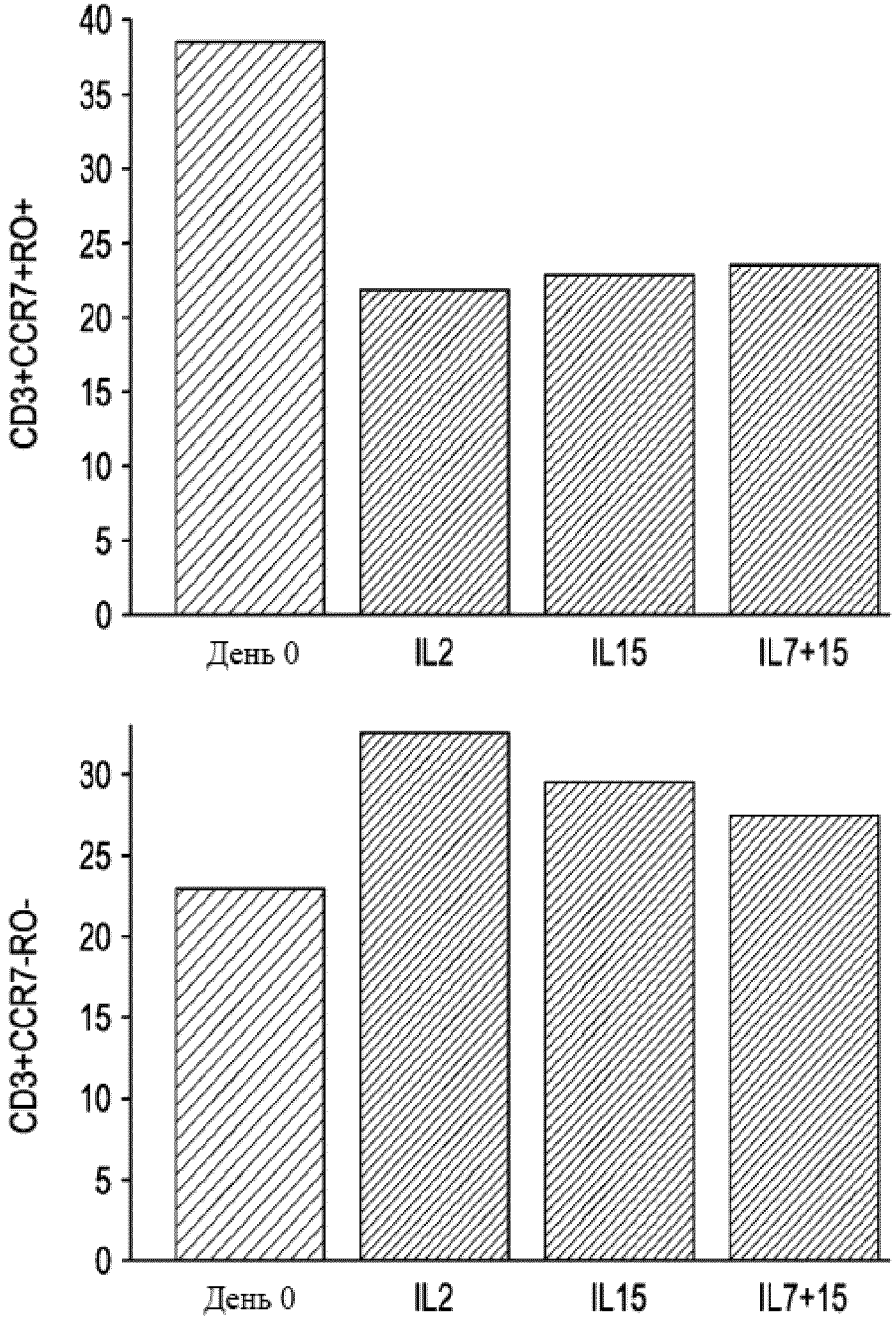
Меньше центральных клеток памяти наблюдается через 24 ч.



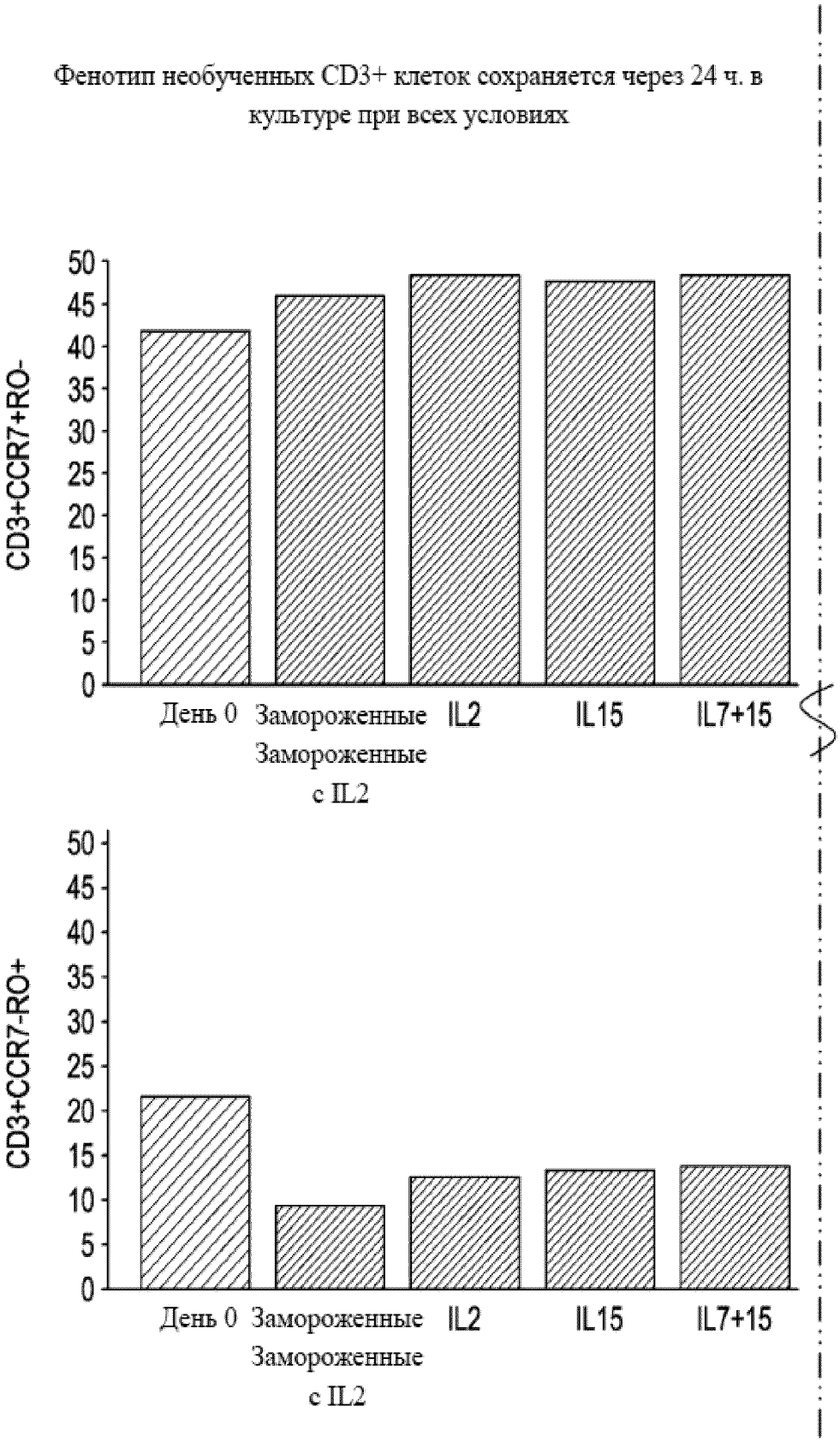
ФИГ. 1H (часть 1)

Без изменений в фенотипе необученных клеток

Меньше центральных клеток памяти наблюдается через 24 ч.

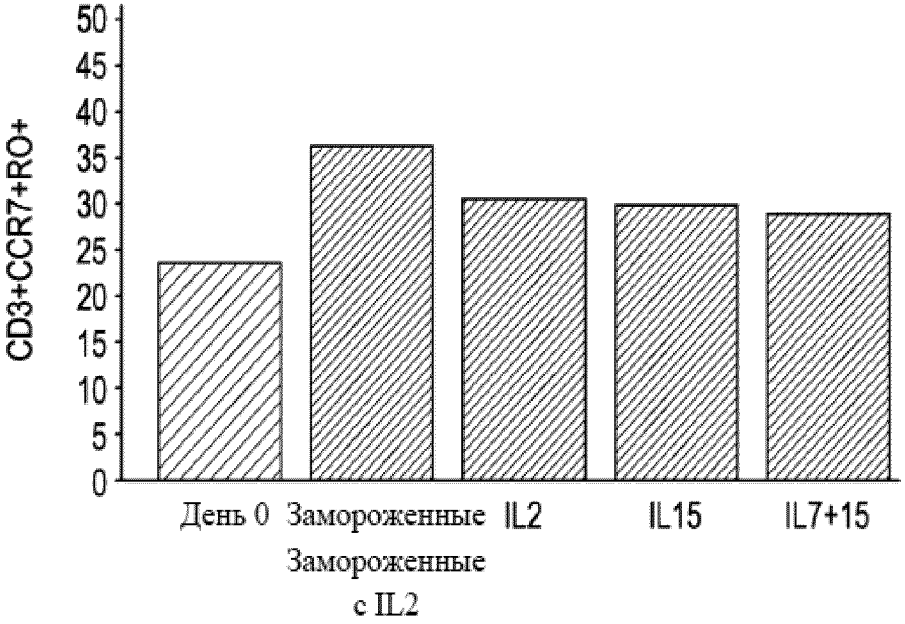


ФИГ. 1H (часть 2)



ФИГ. 1I (часть 1)

Фенотип необученных CD3+ клеток сохраняется через 24 ч. в культуре при всех условиях





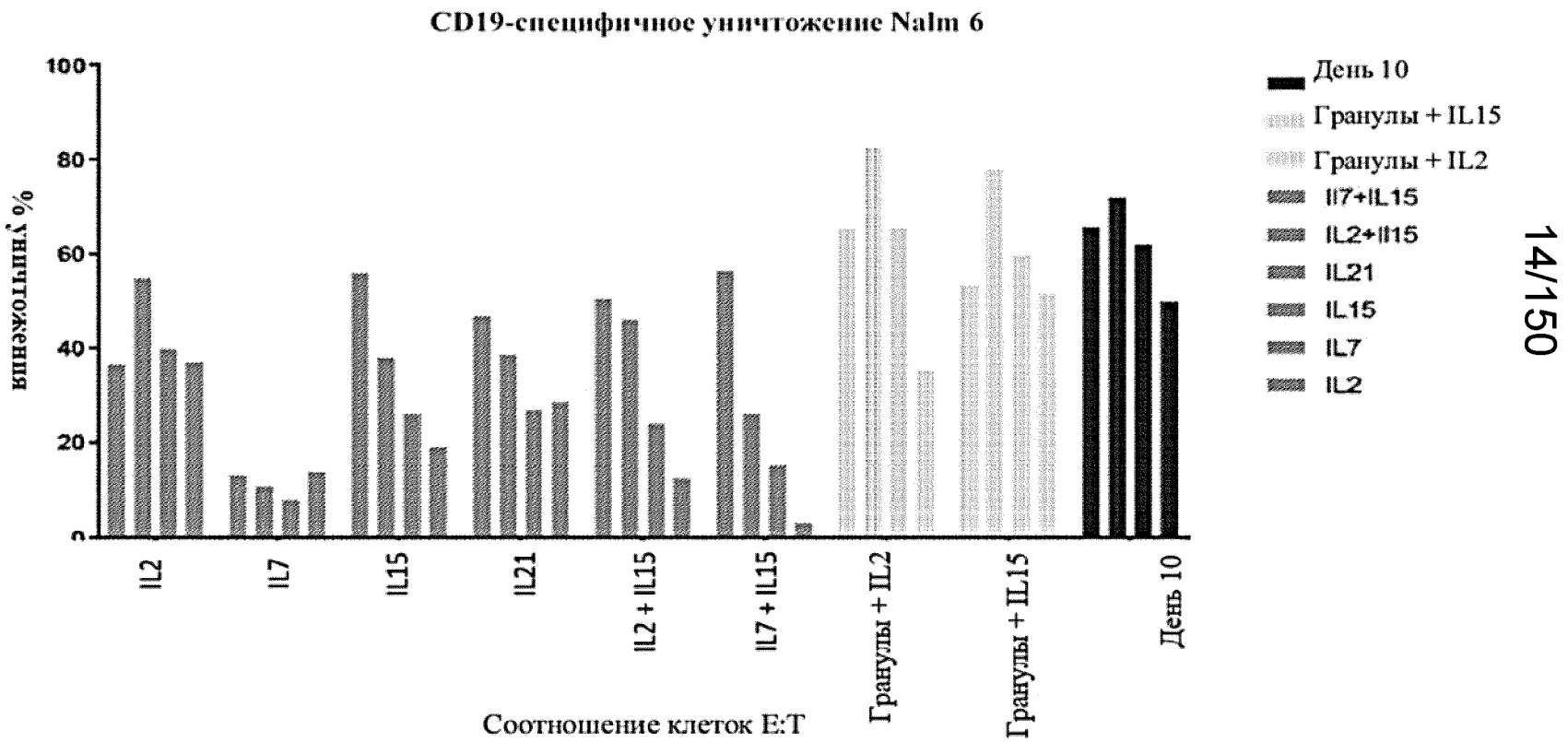
ФИГ. 1I (часть 2)

ФИГ. 2А

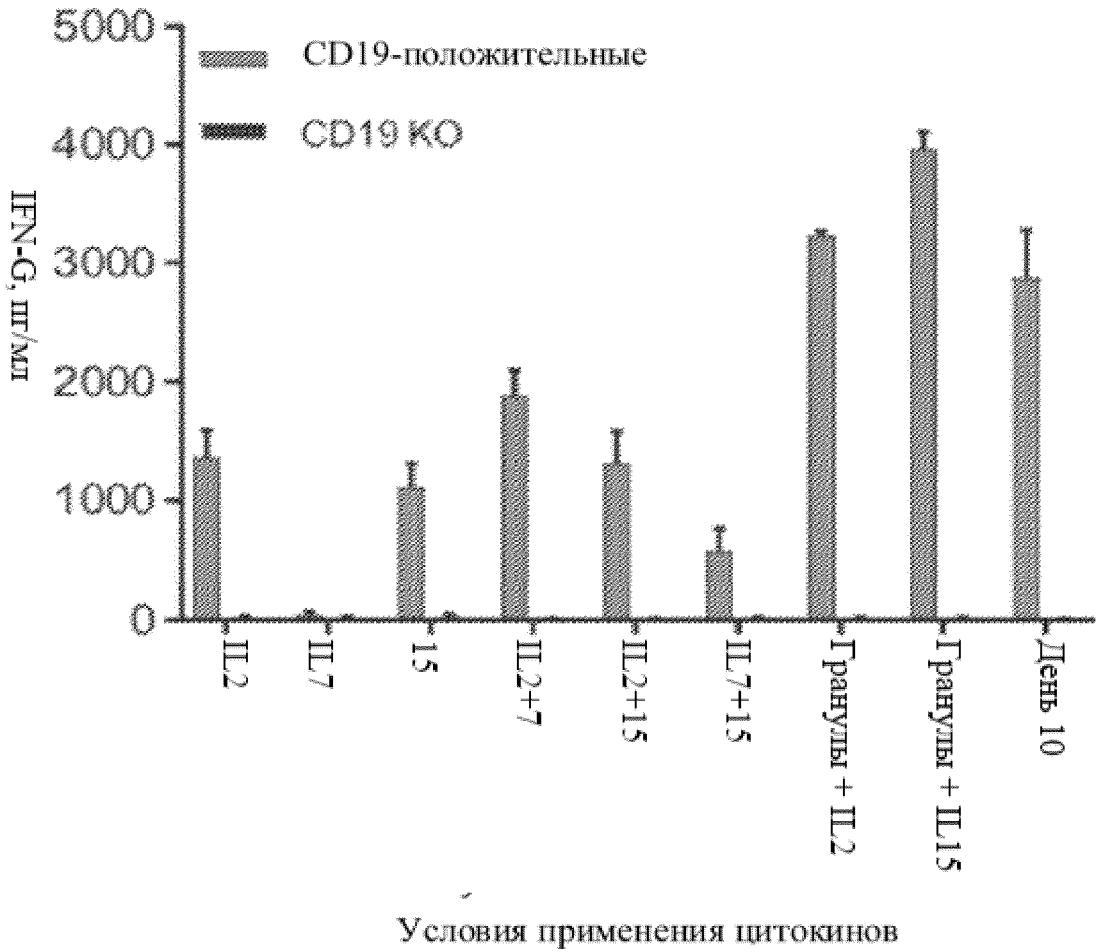
День 10
Среднее значение (CD3+ CAR+)
30
25
20
15
10
5
0
IL2
IL7
IL15
IL2 + IL7
IL2 + IL15
IL7 + IL15
Гранулы + IL2
Гранулы + IL15
Условие

День 1
Среднее значение (CD3+ CAR+)
30
20
10
0
IL2
IL7
IL15
IL2 + IL7
IL2 + IL15
IL7 + IL15
Гранулы + IL2
Гранулы + IL15
Условие

ФИГ. 2B


CD19-специфичное уничтожение Nalm 6
% уничтожения
100
80
60
40
20
0
IL2
IL7
IL15
IL21
IL2 + IL15
IL7 + IL15
Гранулы + IL2
Гранулы + IL15
День 10
Соотношение клеток E:T
День 10
Гранулы + IL15
Гранулы + IL2
Il7+IL15
IL2+Il15
IL21
IL15
IL7
IL2

ФИГ. 2С


5000
4000
3000
2000
1000
0
IFN-G, пг/мл
CD19-положительные
CD19 KO
IL2
IL7
15
IL2+7
IL2+15
IL7+15
Гранулы + IL2
Гранулы + IL15
День 10
Условия применения цитокинов

ФИГ. 2D

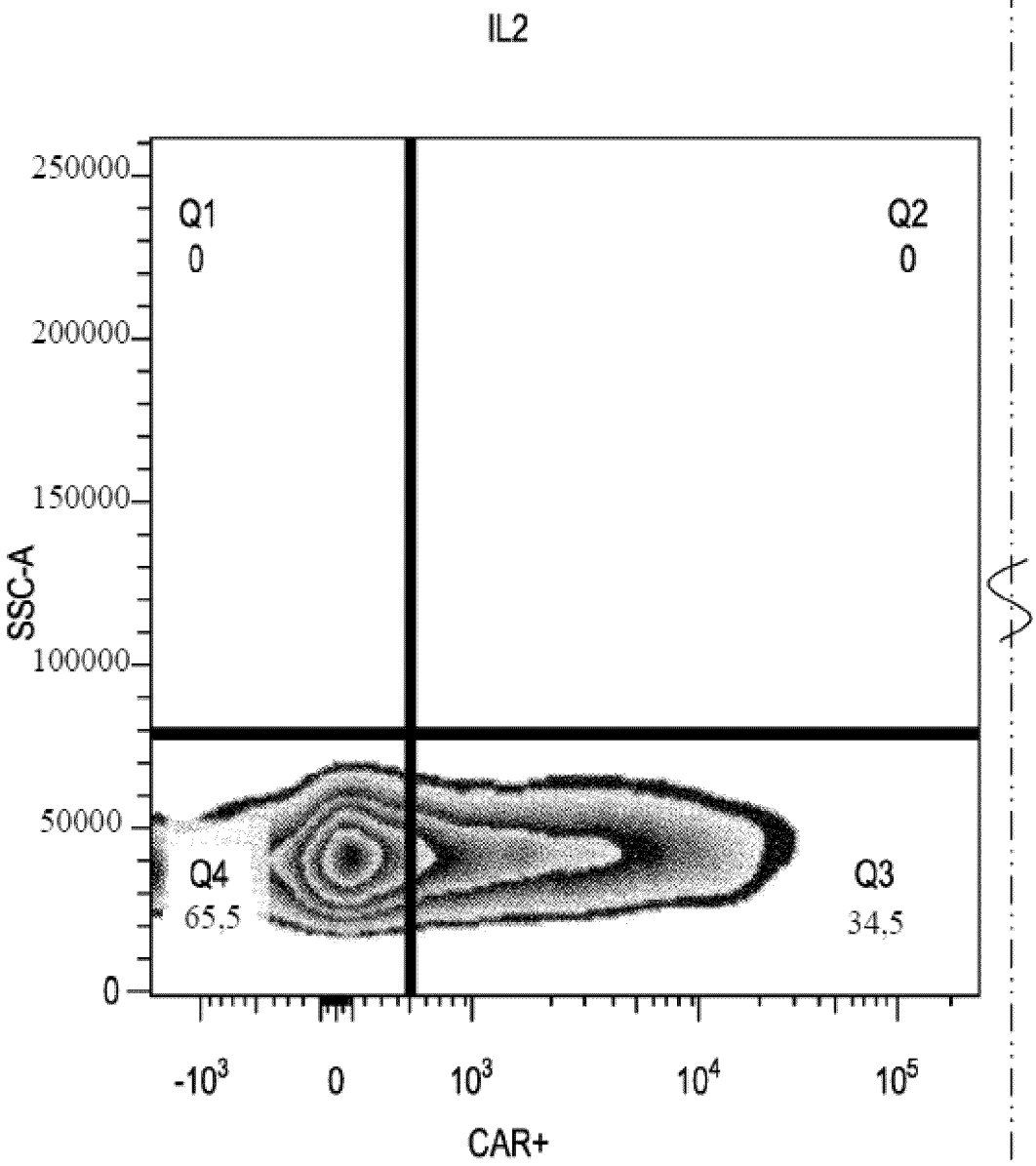
Среднее значение (EDU-специфичные)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
IL2
IL7
IL15
IL2 + IL7
IL2 + IL15
IL7 + IL15
Гранулы + IL2
Гранулы + IL15
День 10
Условие

ФИГ. 3А

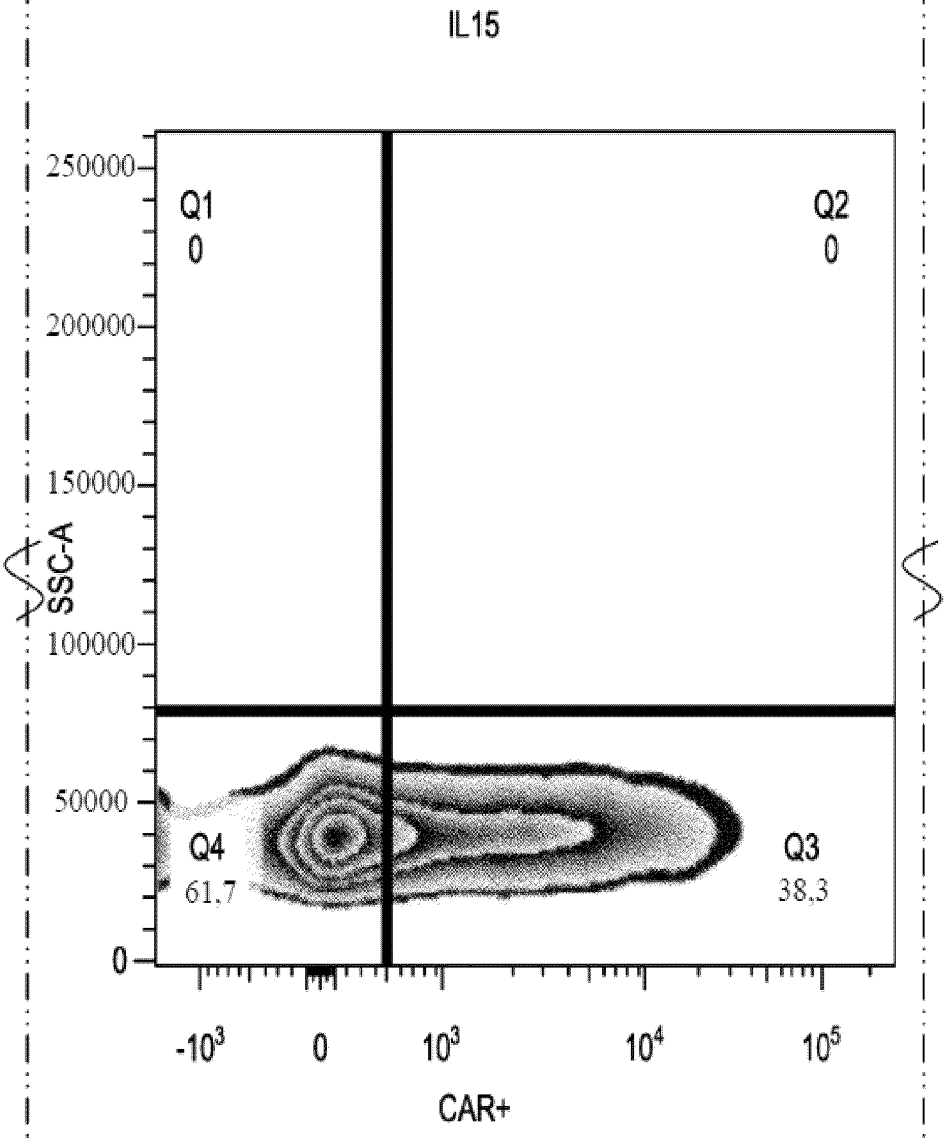
CD3+/CAR+
30
20
10
0
4,56
9,51
17,60
28,80
IL15
0,22
12,70
26,50
34,30
IL2+IL15
4,71
10,10
18,80
31,30
IL2+IL7
5,08
10,40
18,60
32,10
IL7+IL15
1,00
2,50
5,00
10,00
MOI

ФИГ. 3В (часть 1)

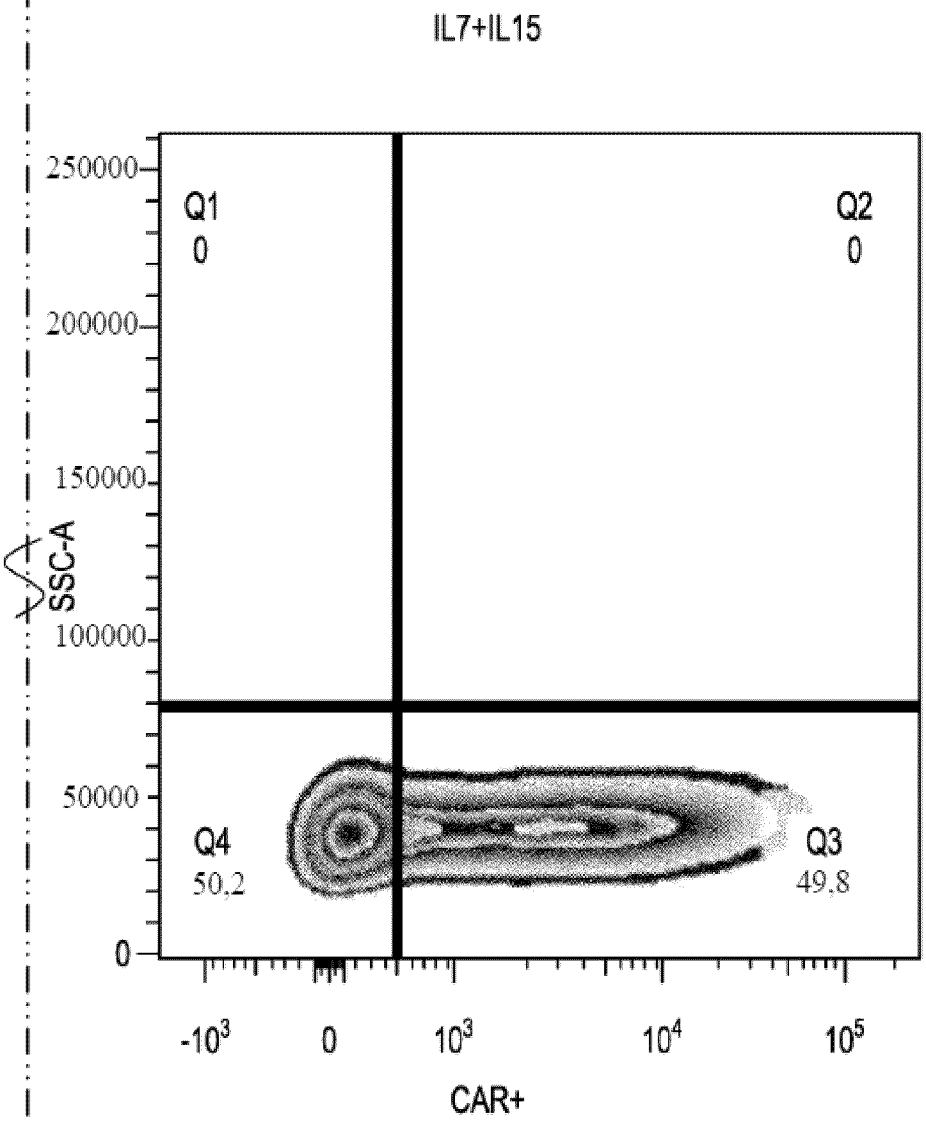
ФИГ. 3В (часть 2)



ФИГ. 4А (часть 1)

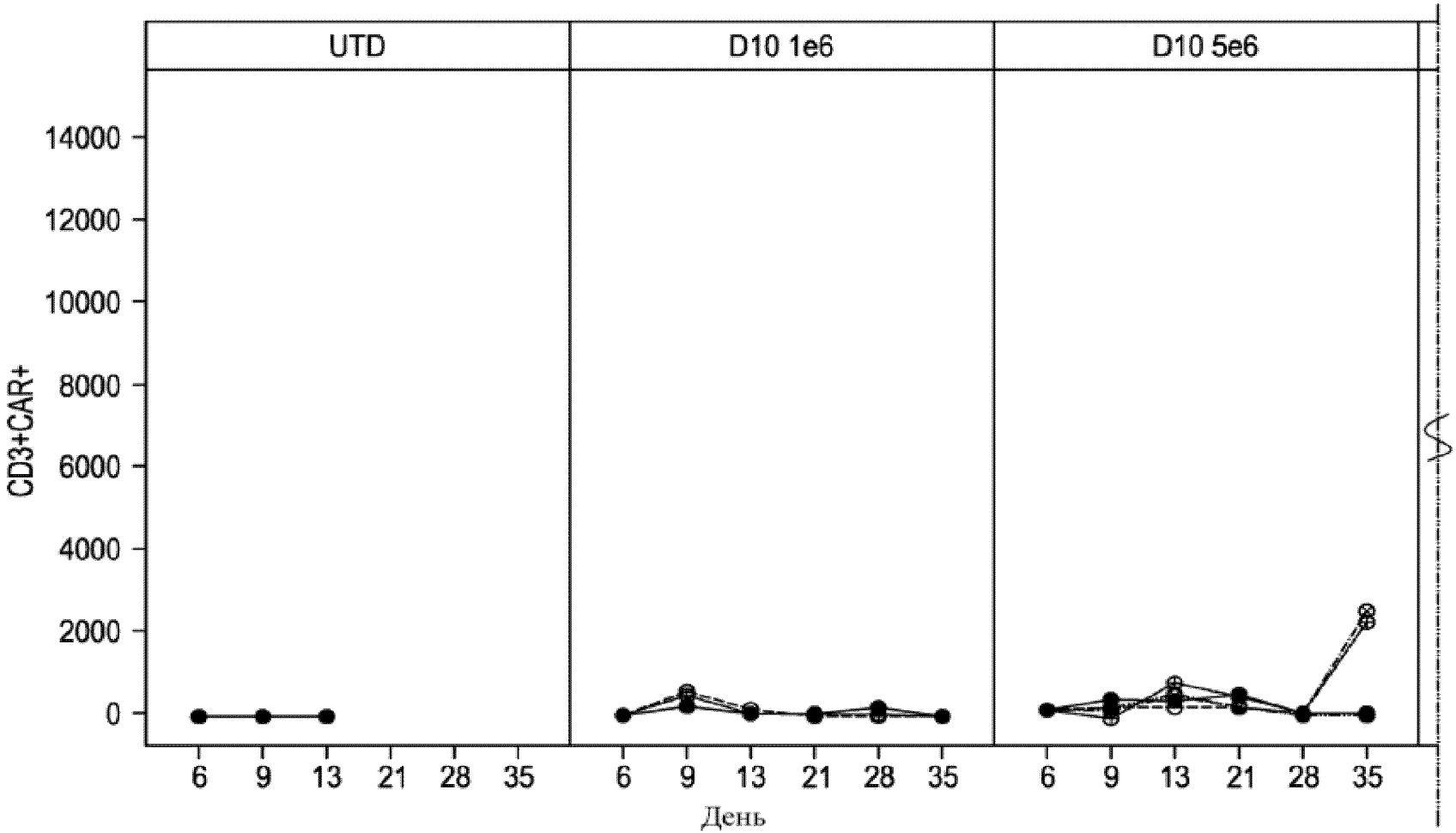


ФИГ. 4А (часть 2)

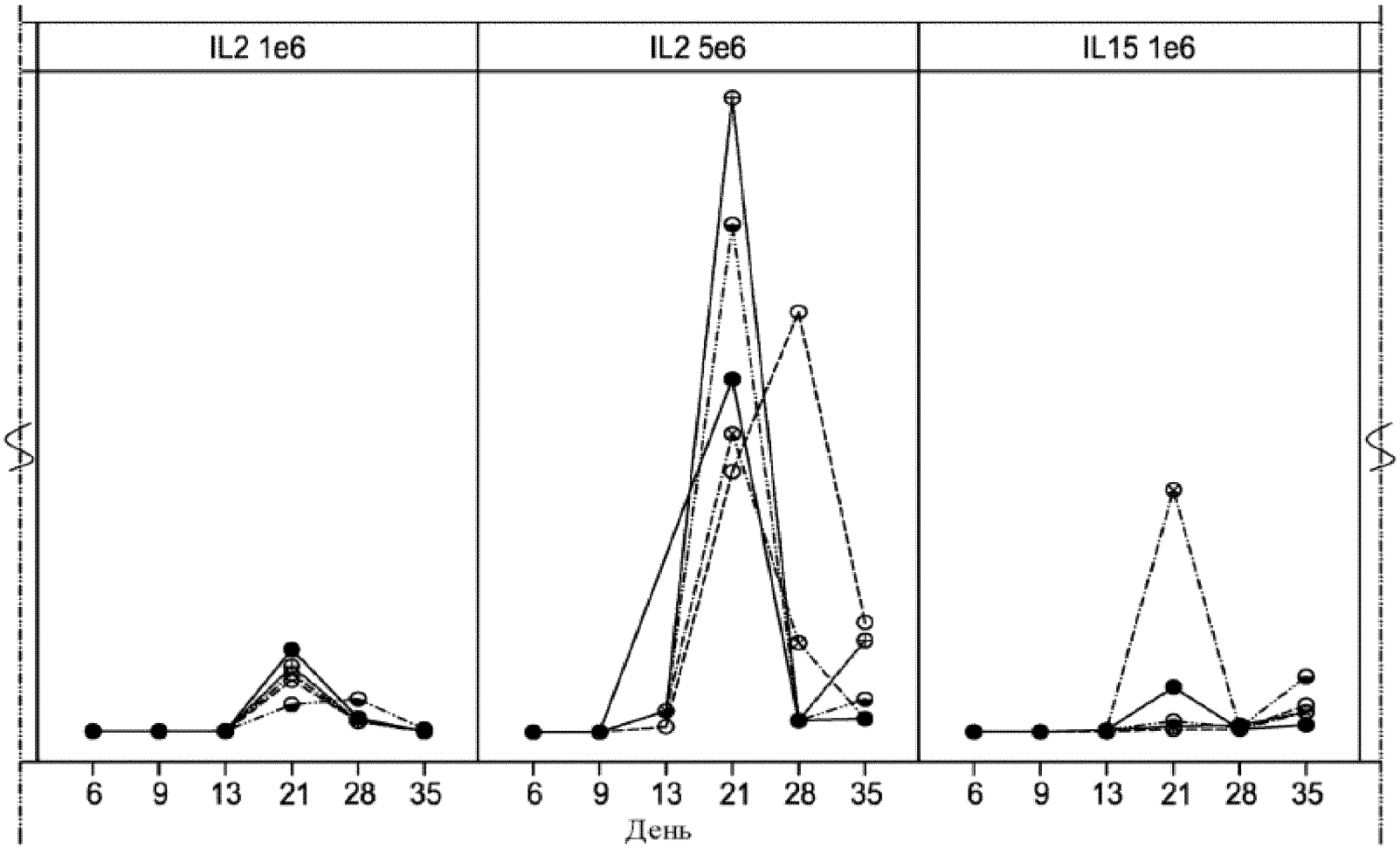


ФИГ. 4А (часть 3)

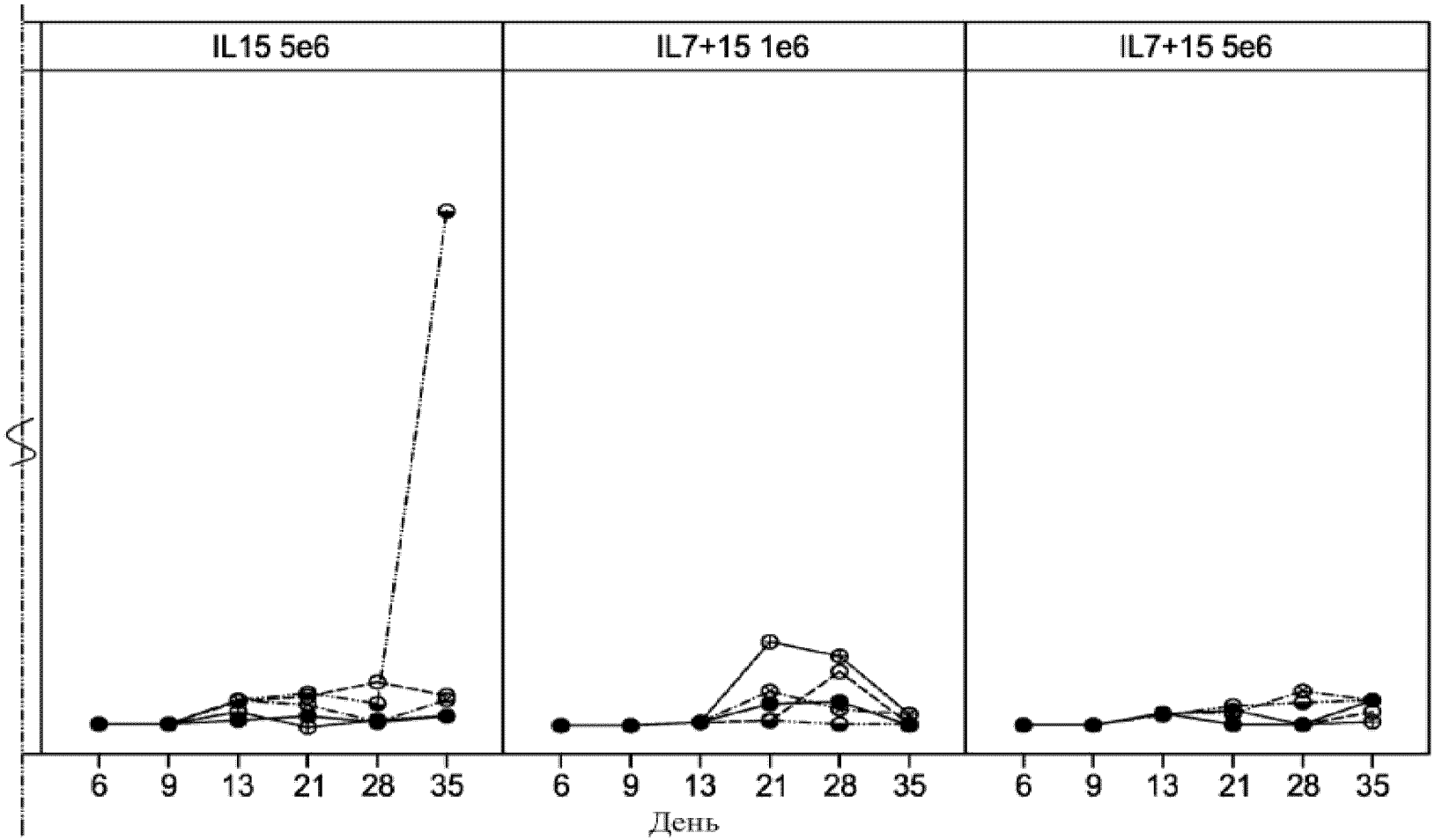
ФИГ. 4B



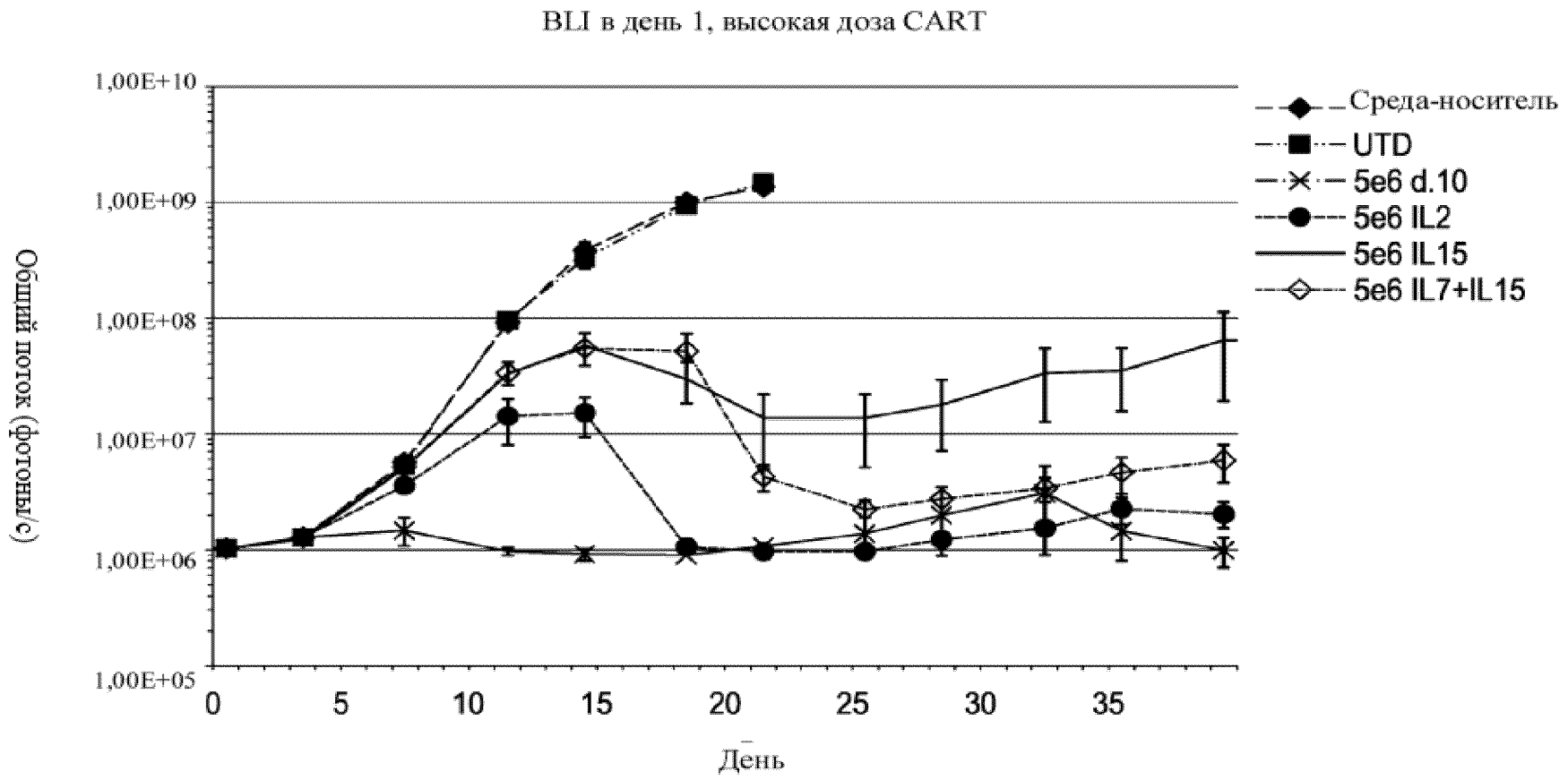
ФИГ. 4C (часть 1)



ФИГ. 4С (часть 2)

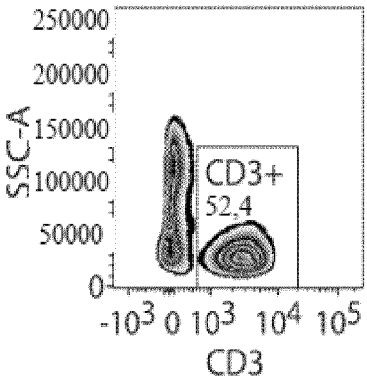


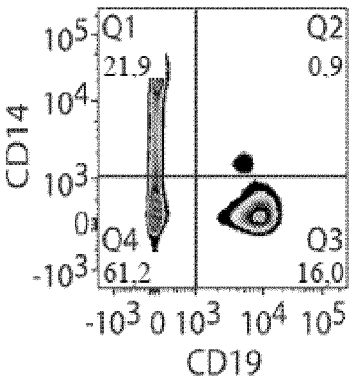
ФИГ. 4С (часть 3)


BLI в день 1, высокая доза CART
Общий поток (фотонов/с)
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
0
5
10
15
20
25
30
35
День
Среда-носитель
UTD
5e6 d.10
5e6 IL2
5e6 IL15
5e6 IL7+IL15

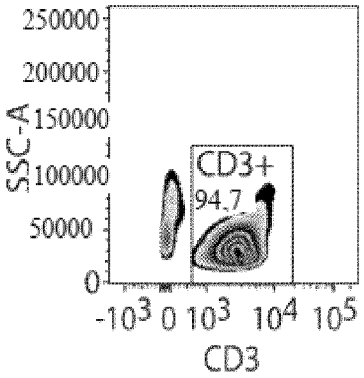
ФИГ. 4D

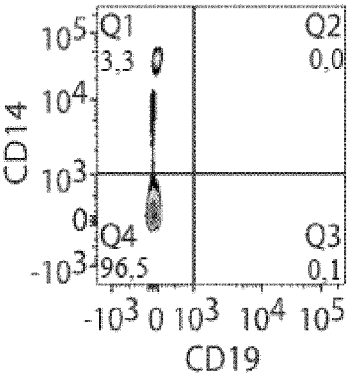
Лейкоцитарная масса



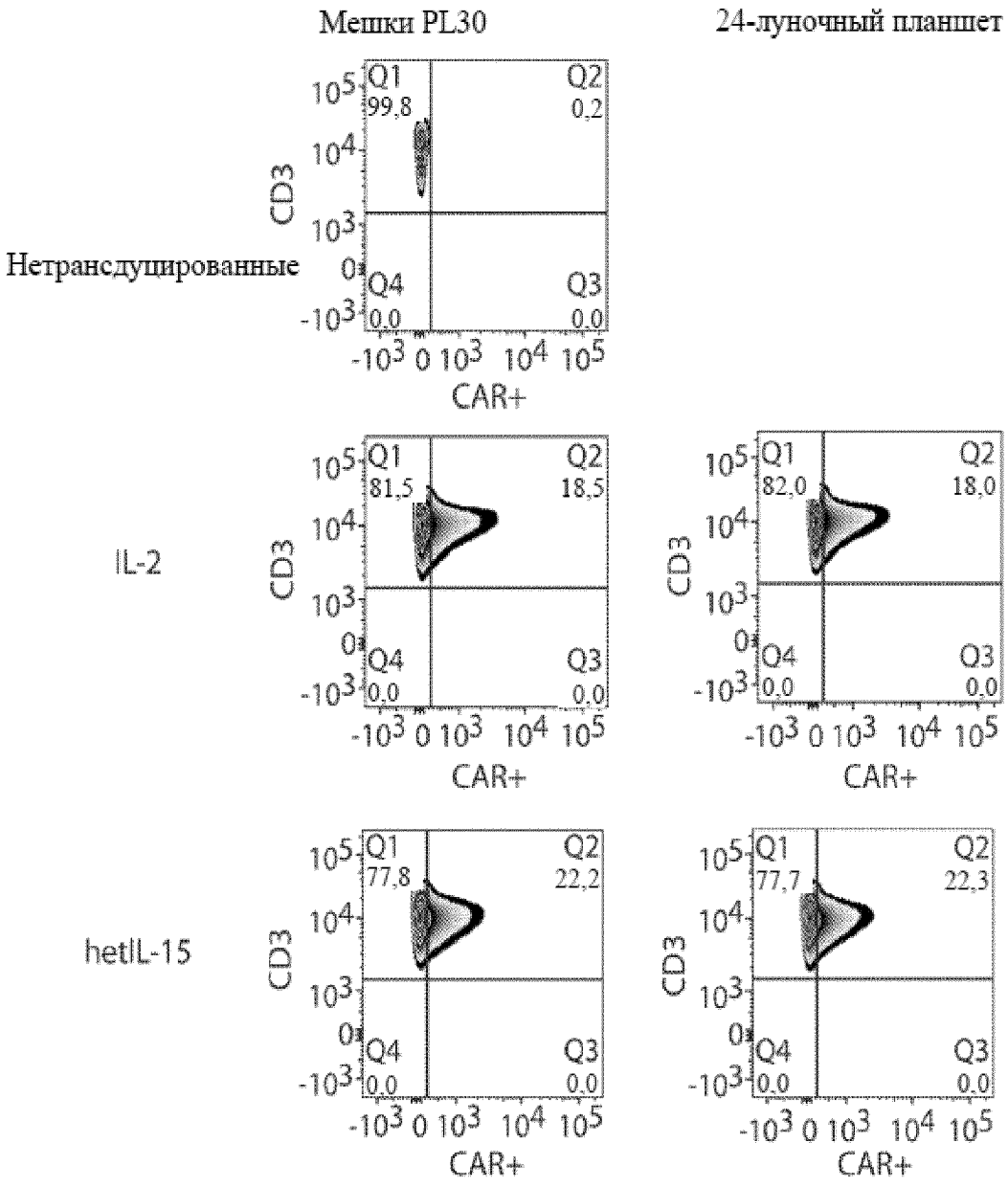


После обогащения по CD4+ и CD8+

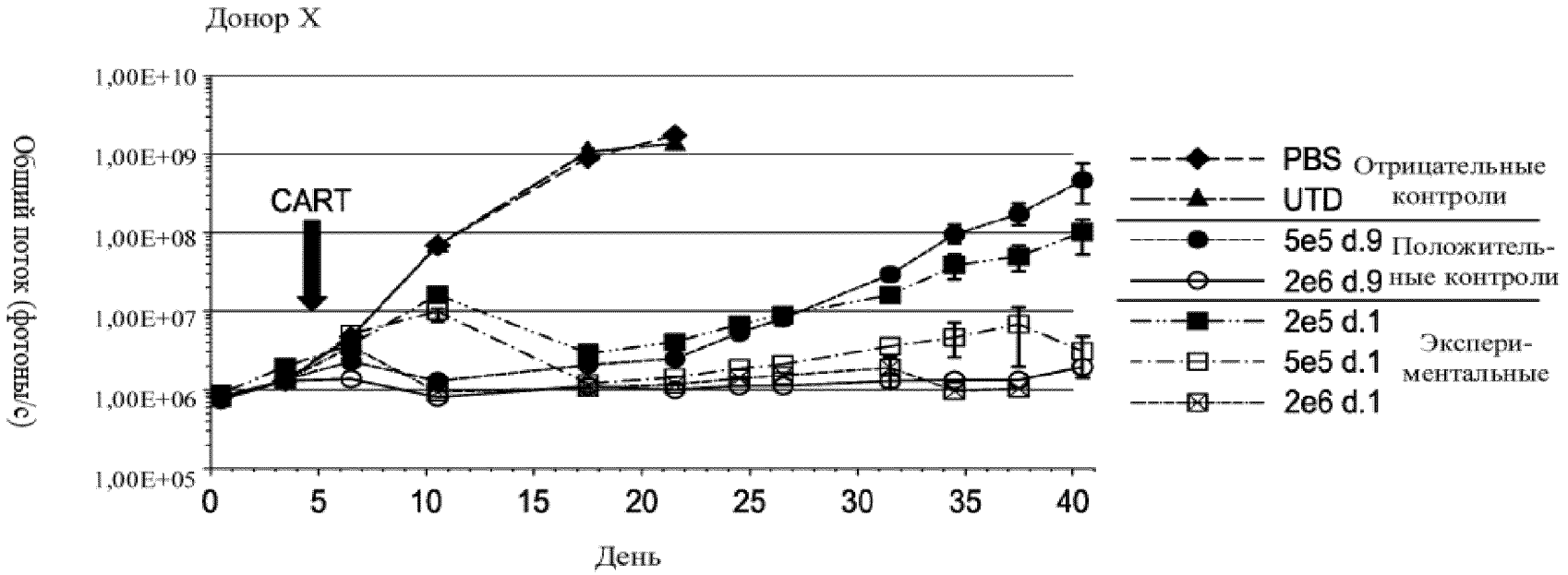




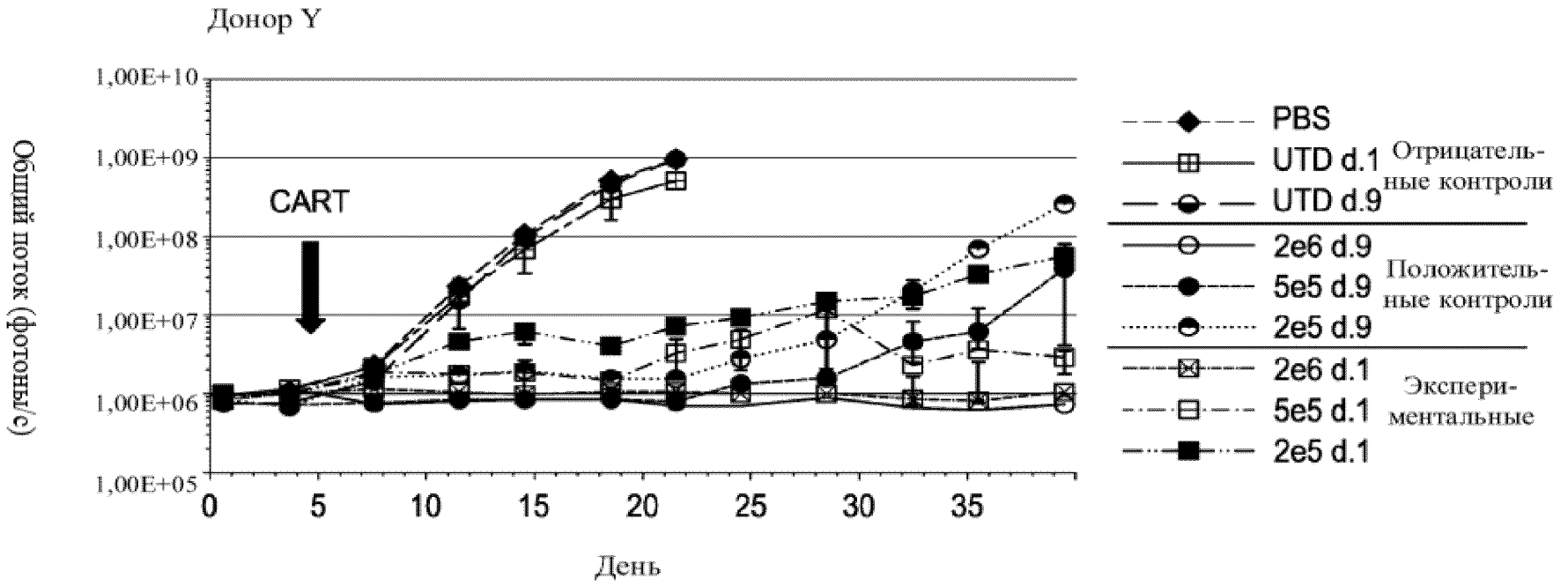
ФИГ. 5А


Мешки PL30
24-луночный планшет
Нетрансдуцированные
IL-2
hetIL-15
Q1
Q2
Q3
Q4
99,8
0,2
81,5
18,5
77,8
22,2
82,0
18,0
77,7
22,3
0,0
CD3
CAR+
-10^3 0 10^3 10^4 10^5

ФИГ. 5B


Донор X
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
Общий поток (фотоны/с)
CART
0
5
10
15
20
25
30
35
40
День
PBS
UTD
Отрицательные контроли
5e5 d.9
2e6 d.9
Положитель-ные контроли
2e5 d.1
5e5 d.1
2e6 d.1
Экспери-ментальные

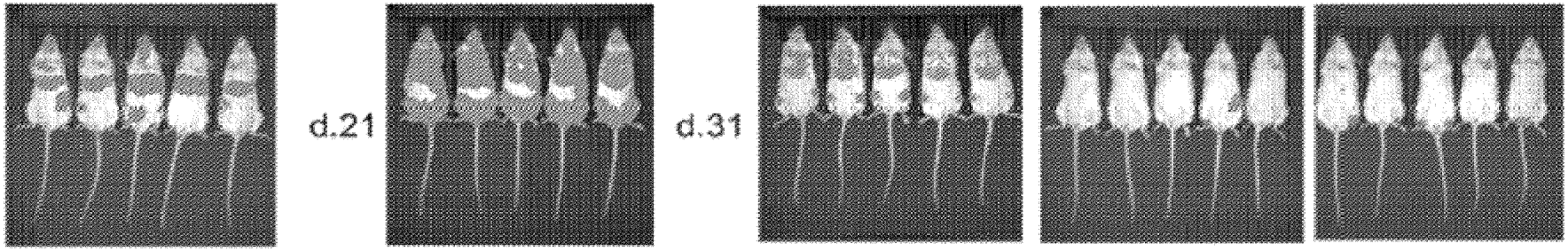
ФИГ. 6A


Донор Y
Общий поток (фотоны/с)
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
CART
0
5
10
15
20
25
30
35
День
PBS
UTD d.1
UTD d.9
Отрицательные контроли
2e6 d.9
5e5 d.9
2e5 d.9
Положительные контроли
2e6 d.1
5e5 d.1
2e5 d.1
Экспериментальные

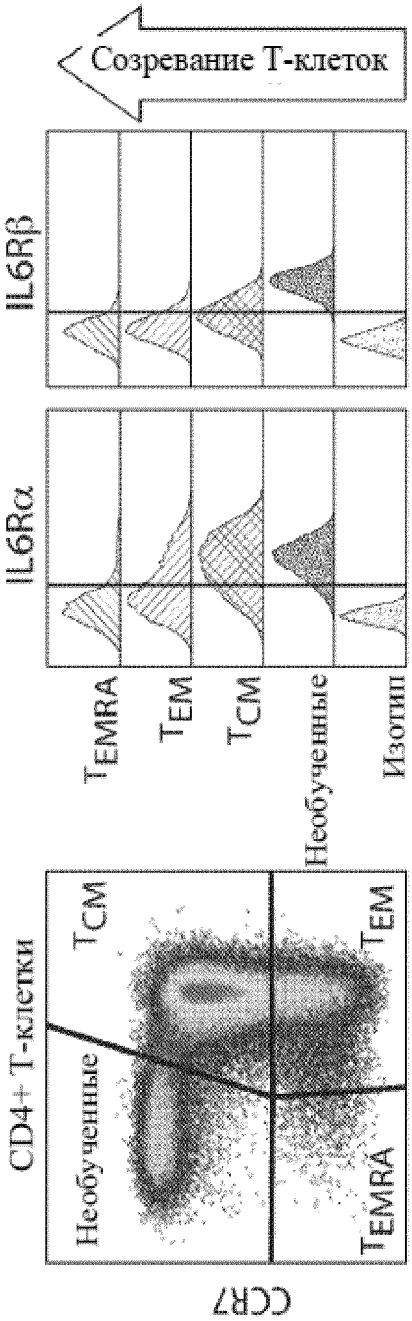
ФИГ. 6В

ФИГ. 6С

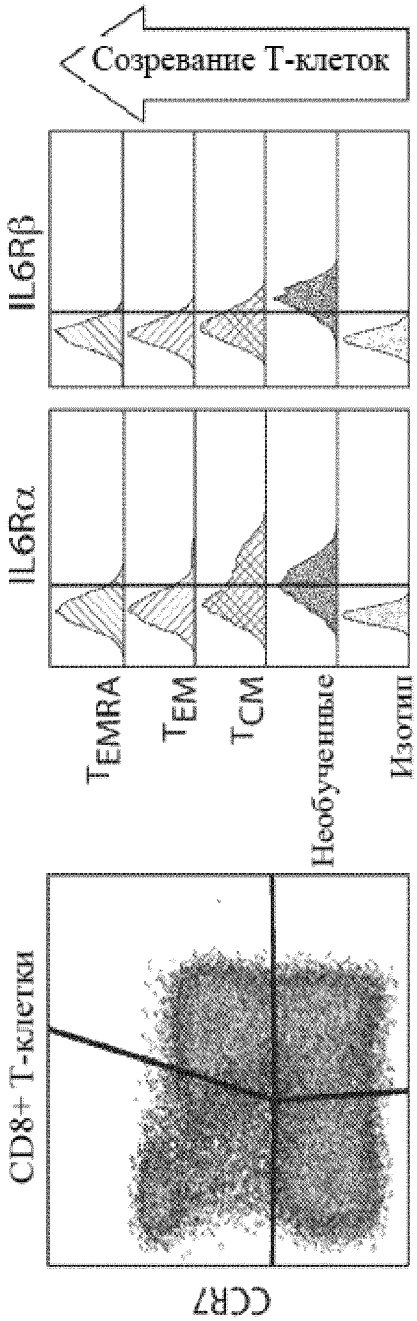
Иллюстративные изображения – донор 2



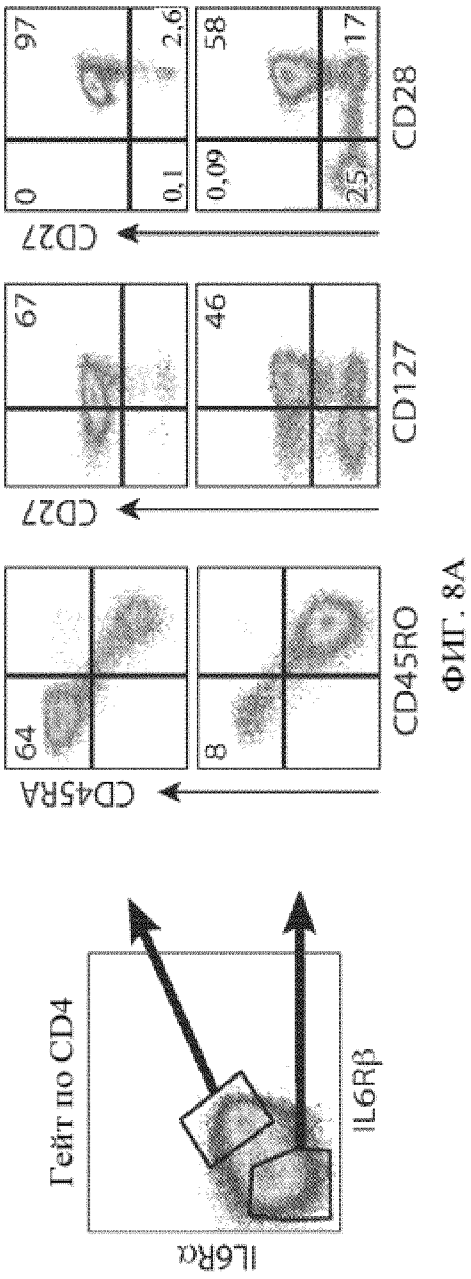
Иллюстративное изображение до рандомизации


Созревание Т-клеток
IL6Rβ
IL6Rα
TEMRA
TEM
TCM
Необученные
Изотип
CD4+ Т-клетки
TCM
TEM
Необученные
TEMRA
CD45RO
CCR7

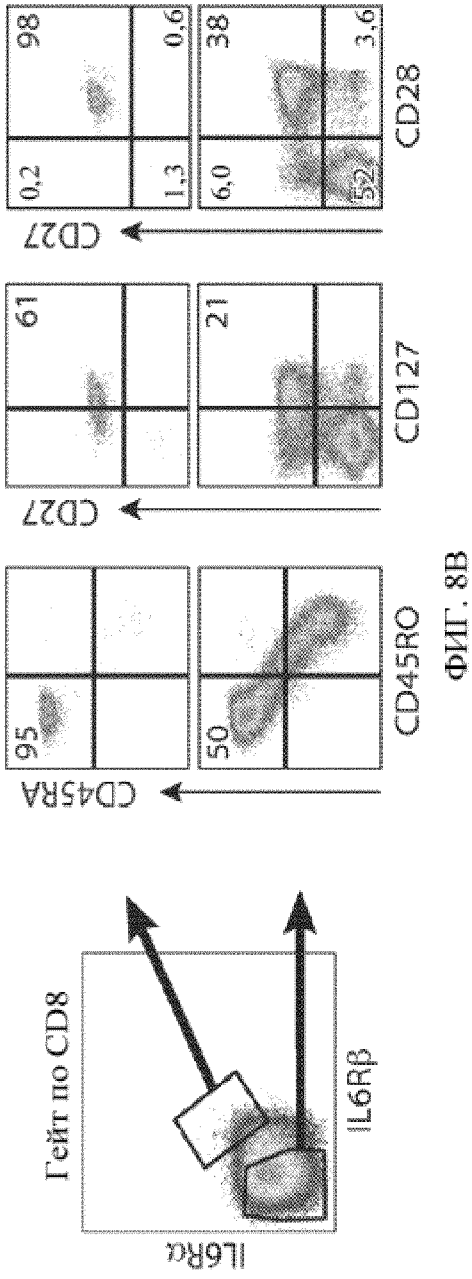
ФИГ. 7A


Созревание Т-клеток
IL6Rβ
IL6Rα
TEMRA
TEM
TCM
Необученные
Изотип
CD8+ Т-клетки
CD45RO
CCR7

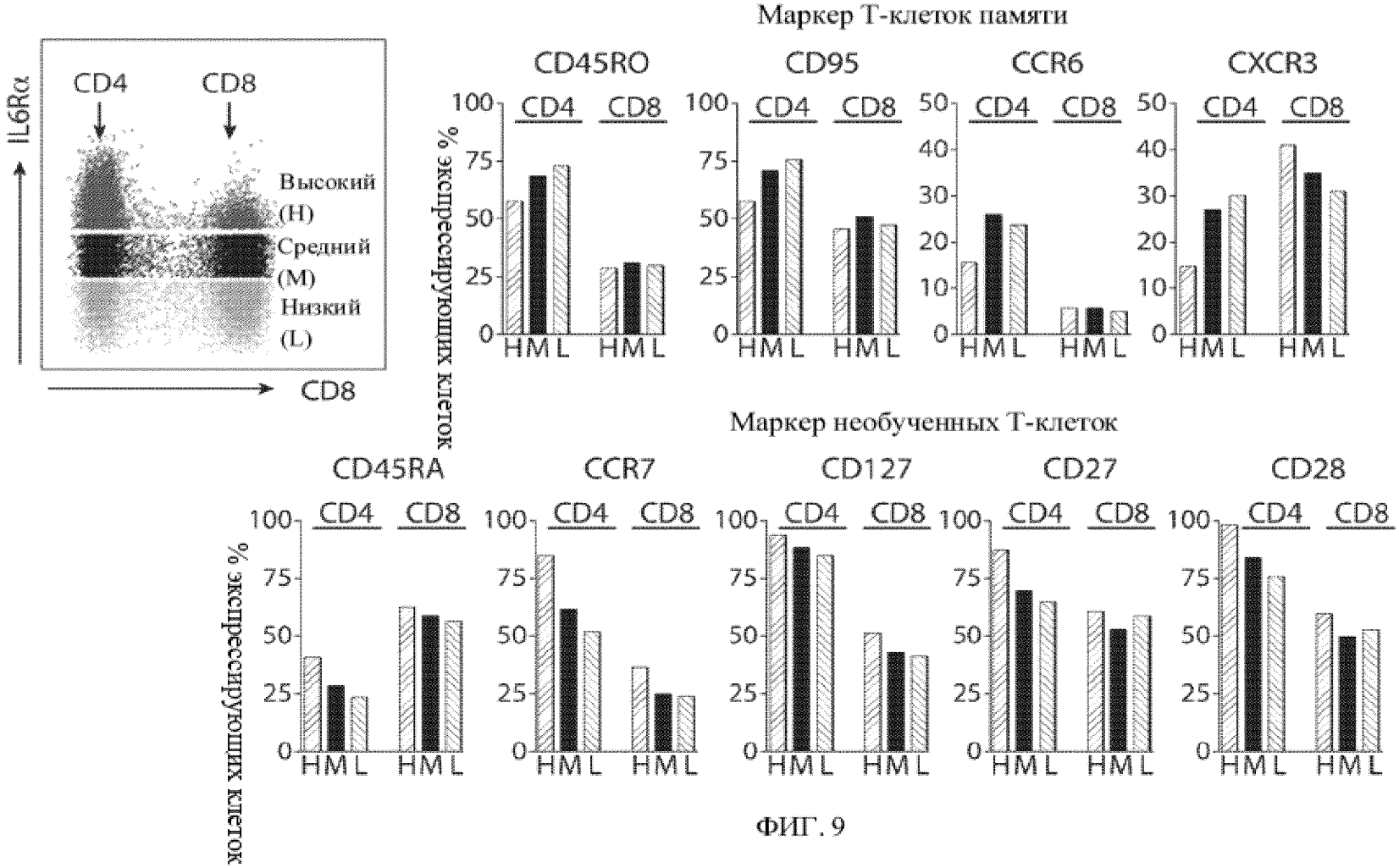
ФИГ. 7B


Гейт по CD4
IL6Rα
IL6Rβ
CD45RA
CD45RO
64
8
CD27
CD127
67
46
CD27
CD28
97
0
2,6
0,1
58
0,09
17
25

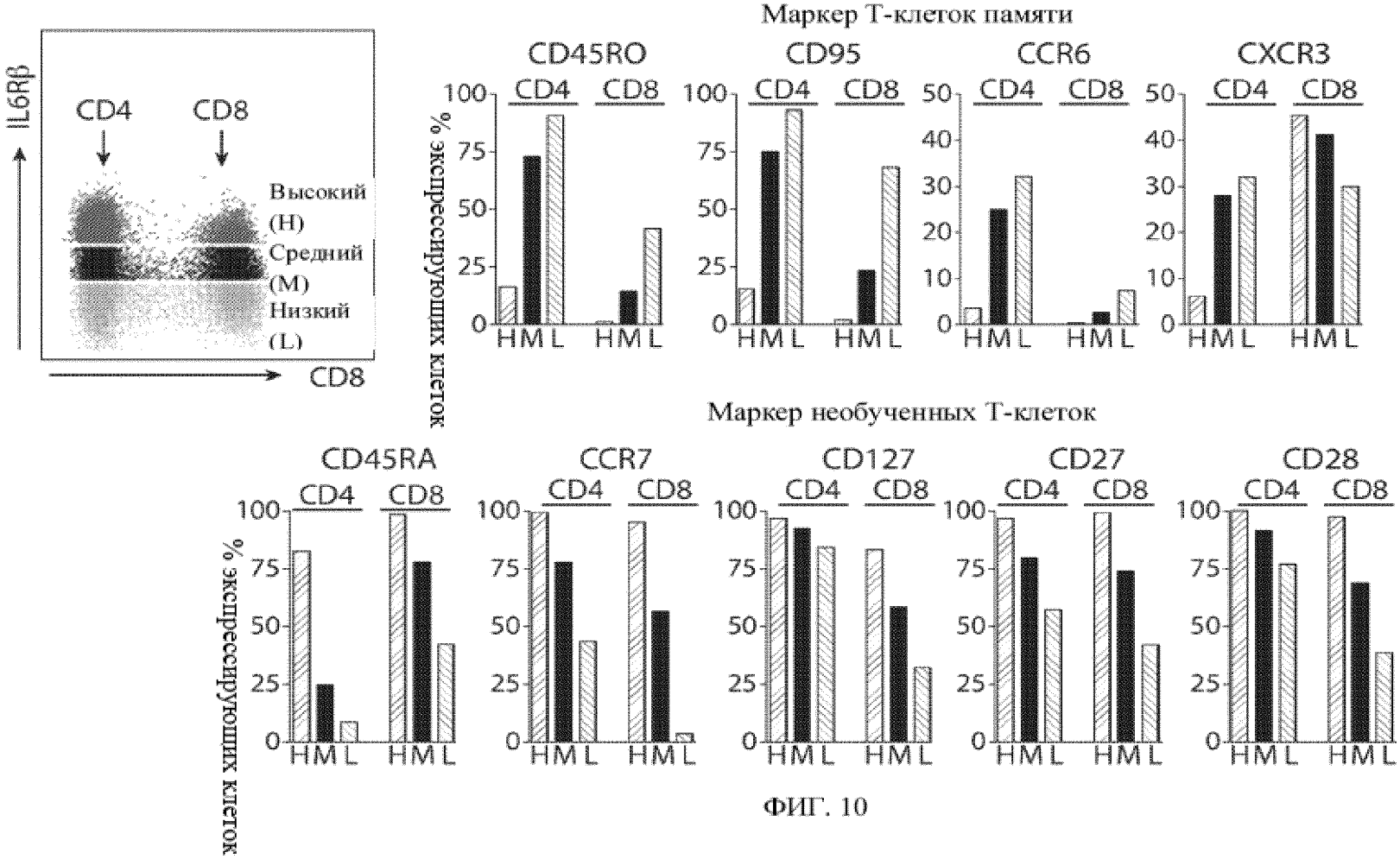
ФИГ. 8A


Гейт по CD8
IL6Rα
IL6Rβ
CD45RA
CD45RO
95
50
CD27
CD127
61
21
CD27
CD28
98
0,2
0,6
1,3
38
6,0
3,6
52

ФИГ. 8B

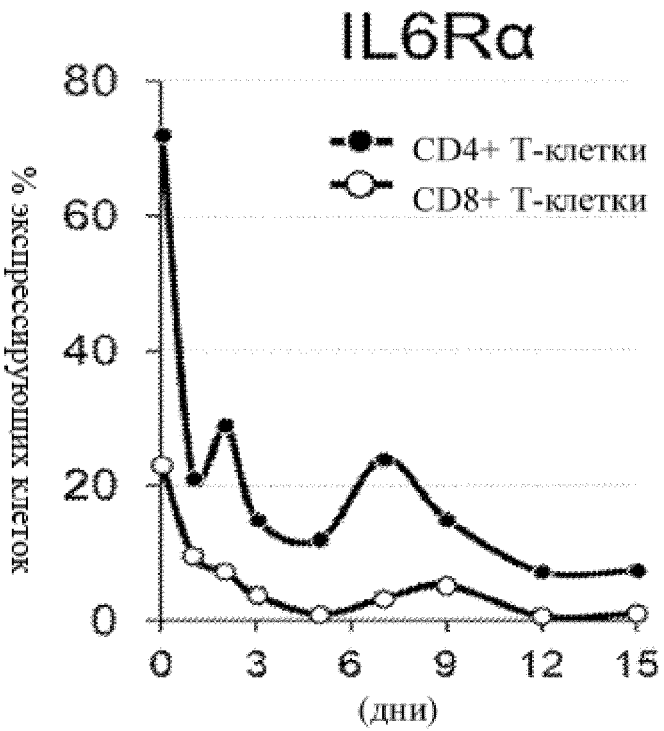

IL6Rα
CD4
CD8
Высокий
(H)
Средний
(M)
Низкий
(L)
CD8
Маркер Т-клеток памяти
CD45RO
CD95
CCR6
CXCR3
% экспрессирующих клеток
Маркер необученных Т-клеток
CD45RA
CCR7
CD127
CD27
CD28

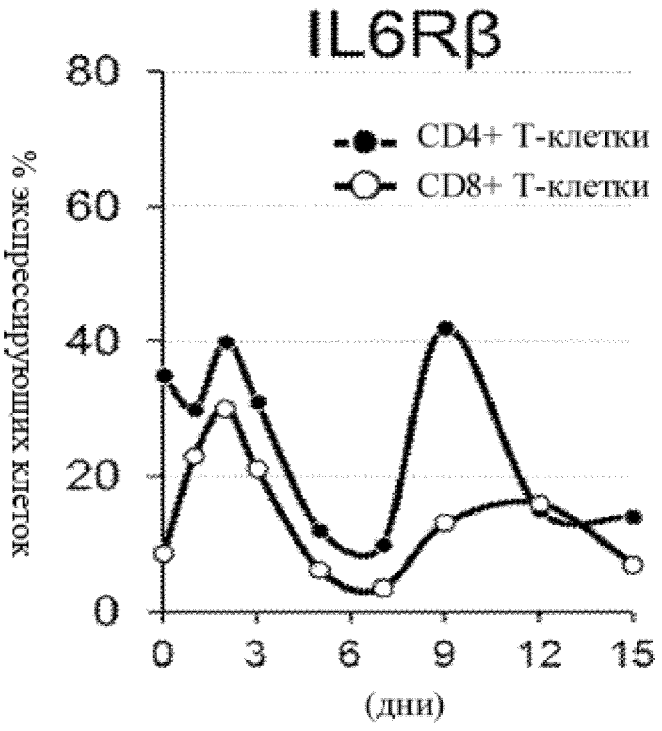
ФИГ. 9


IL6Rβ
CD4
CD8
Высокий
(H)
Средний
(M)
Низкий
(L)
CD8
Маркер Т-клеток памяти
CD45RO
CD95
CCR6
CXCR3
% экспрессирующих клеток
Маркер необученных Т-клеток
CD45RA
CCR7
CD127
CD27
CD28

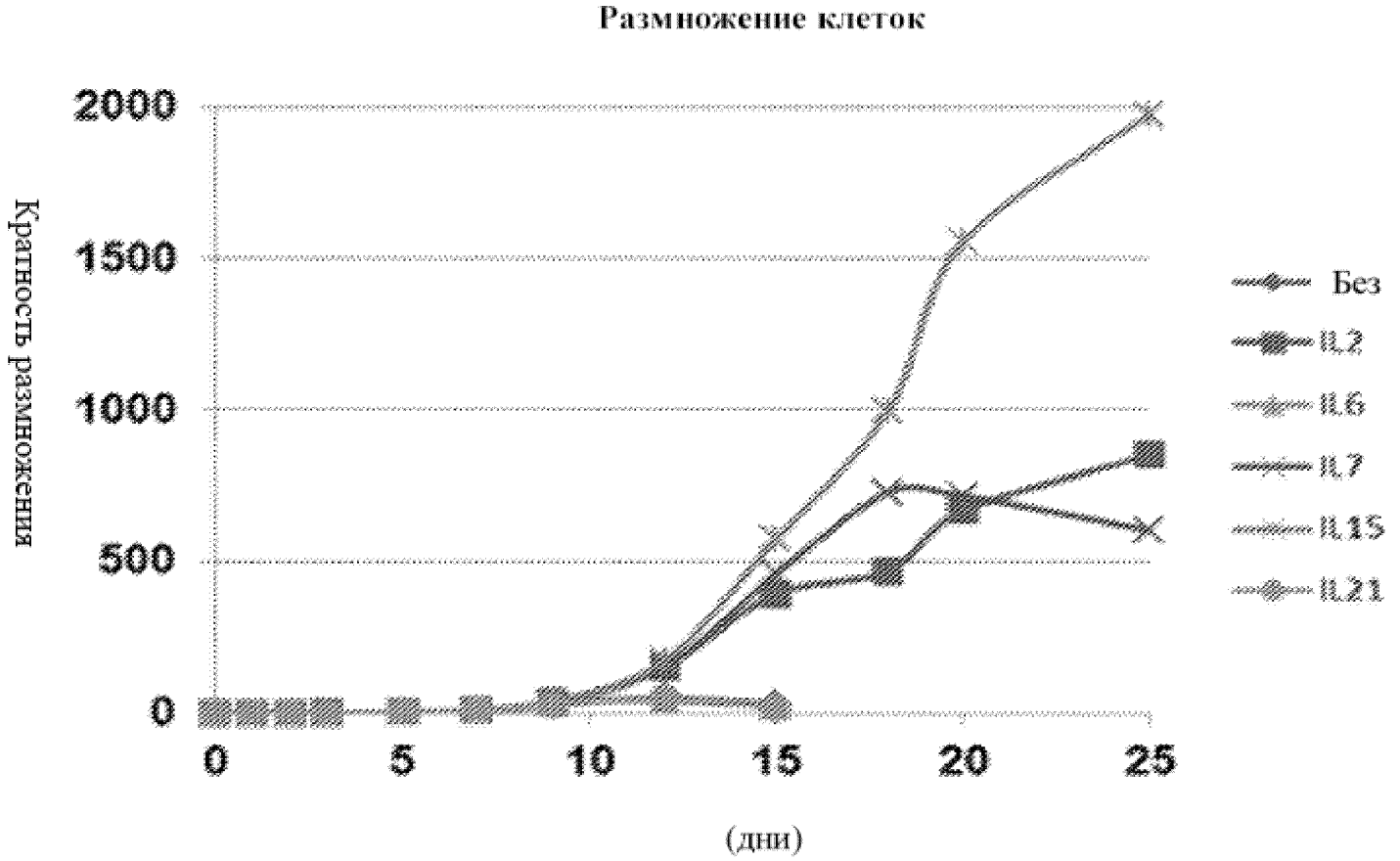
ФИГ. 10

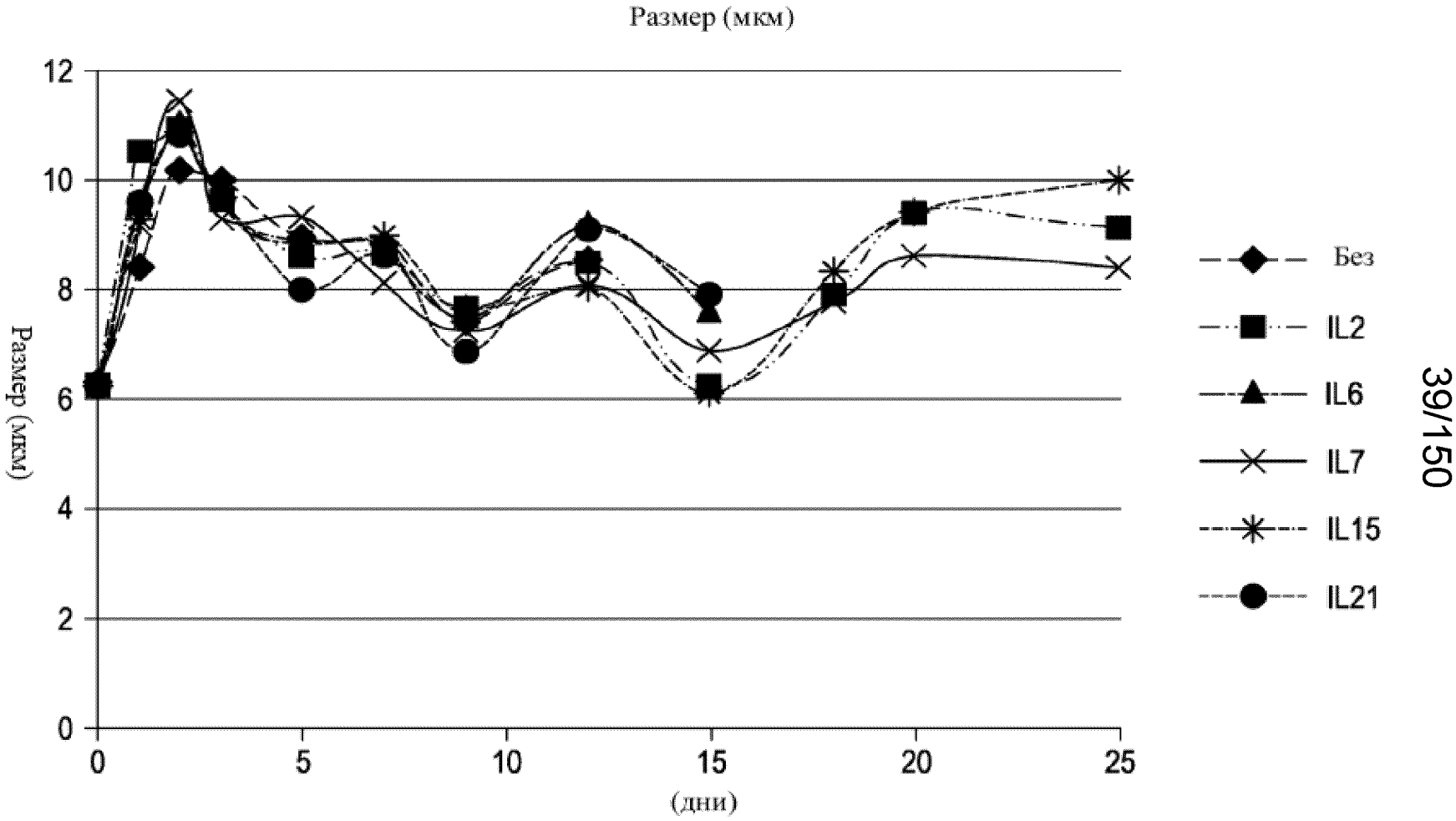
ФИГ. 11


IL6Rα
80
60
40
20
0
% экспрессирующих клеток
CD4+ Т-клетки
CD8+ Т-клетки
0
3
6
9
12
15
(дни)

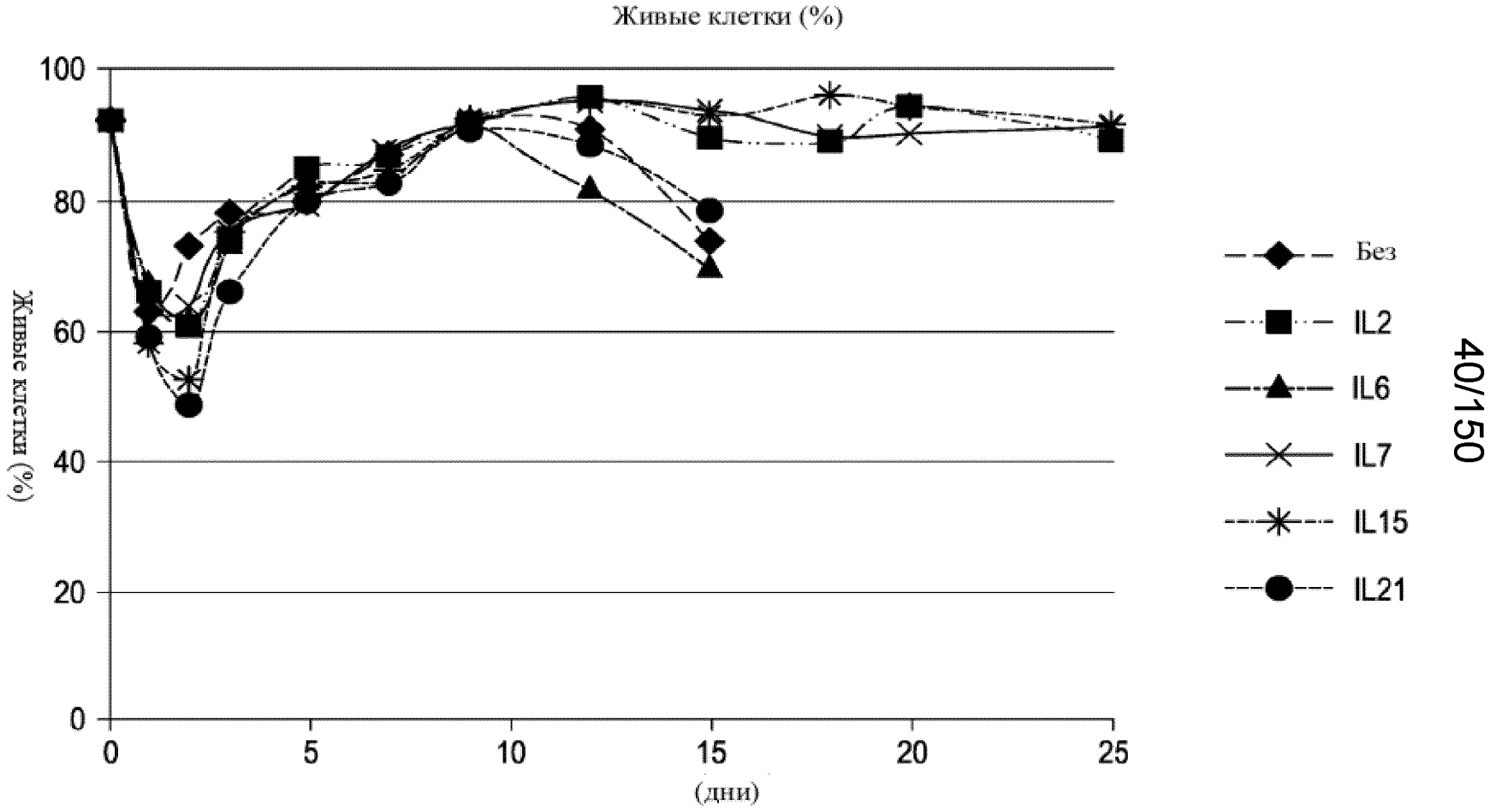

IL6Rβ
80
60
40
20
0
% экспрессирующих клеток
CD4+ Т-клетки
CD8+ Т-клетки
0
3
6
9
12
15
(дни)

ФИГ. 12

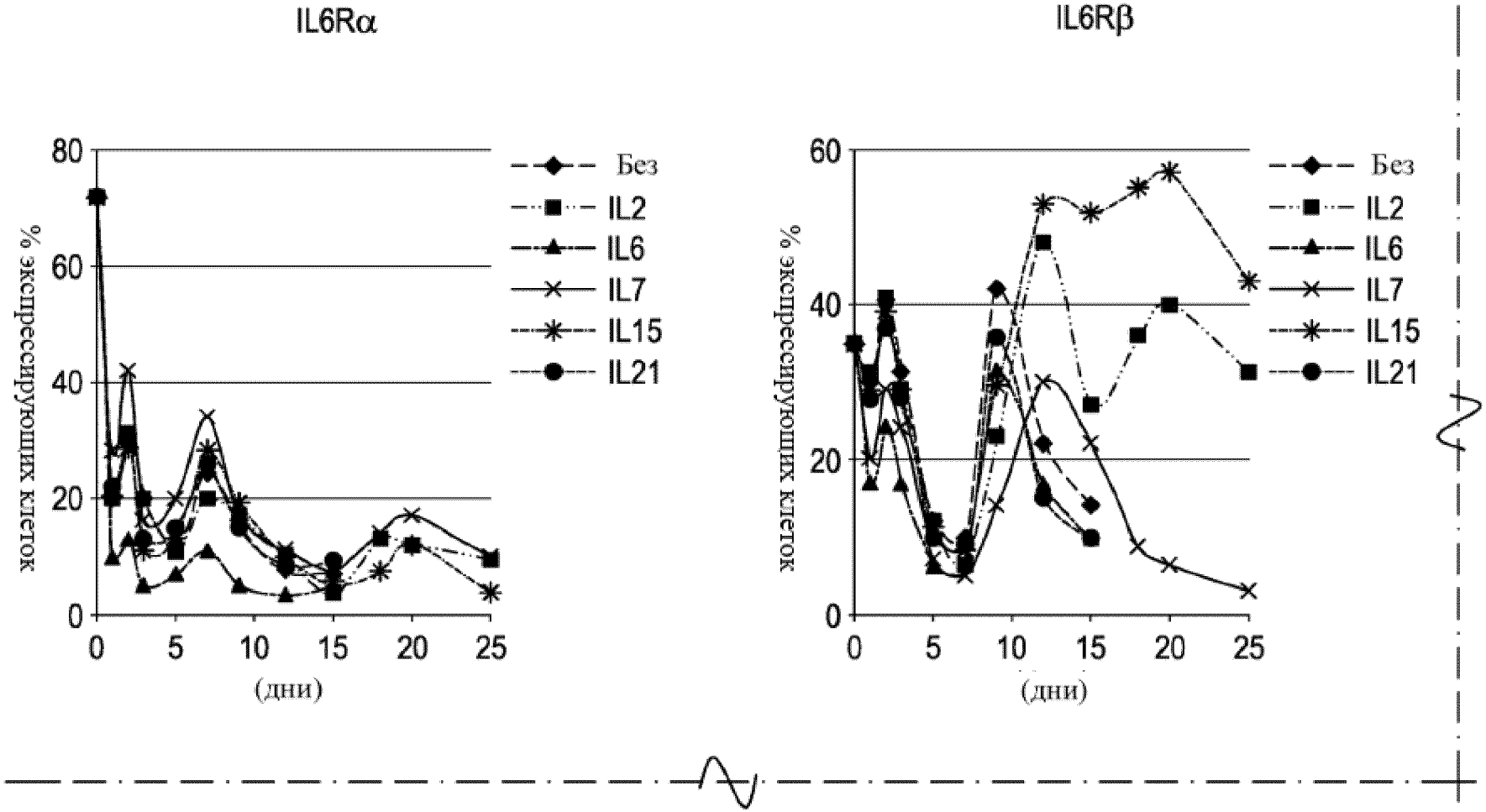

Размножение клеток
Кратность размножения
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
(дни)
Без
IL2
IL6
IL7
IL15
IL21


Размер (мкм)
12
10
8
6
4
2
0
Размер (мкм)
0
5
10
15
20
25
(дни)
Без
IL2
IL6
IL7
IL15
IL21

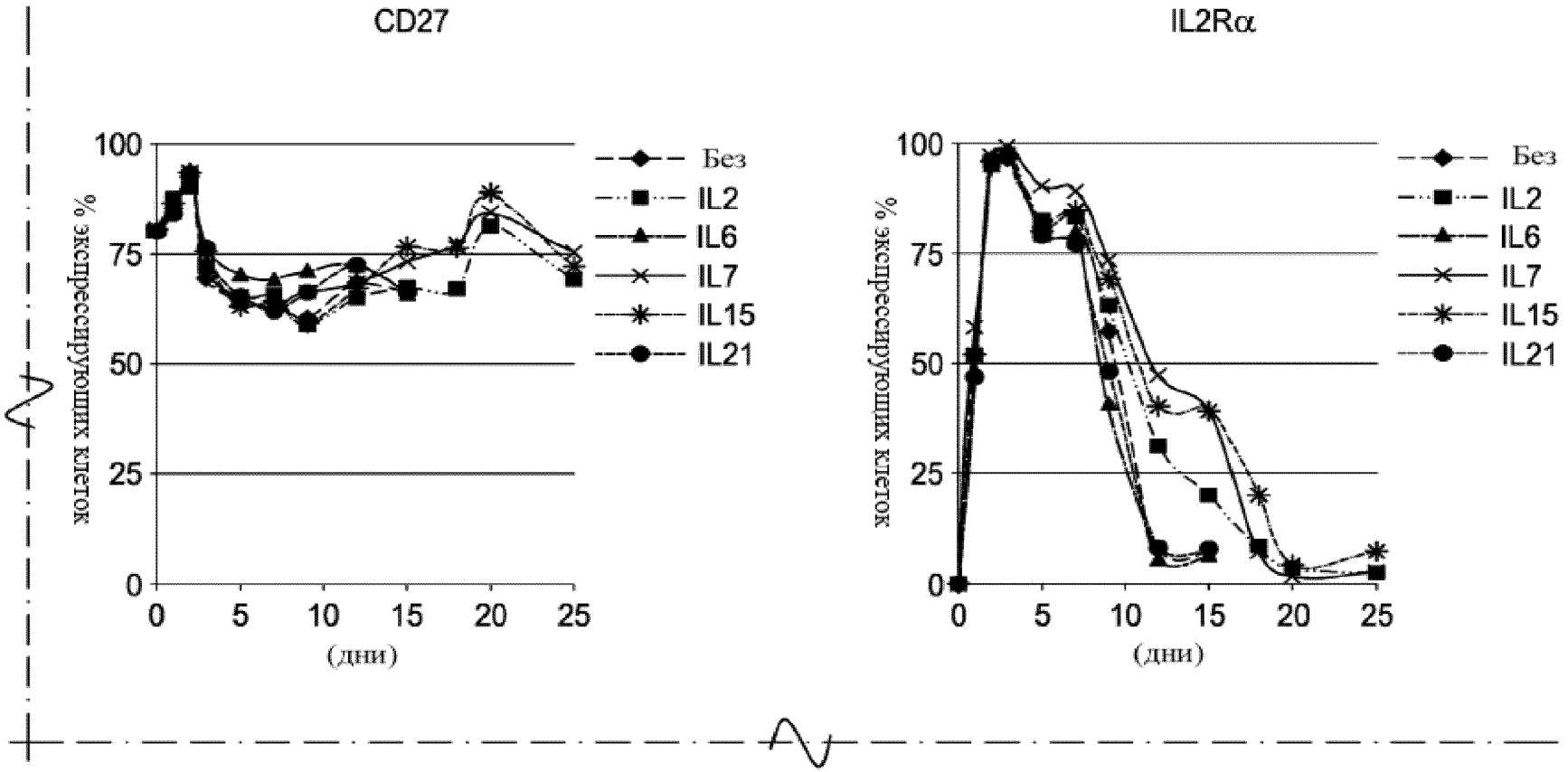
ФИГ. 13А


Живые клетки (%)
100
80
60
40
20
0
Живые клетки (%)
0
5
10
15
20
25
(дни)
Без
IL2
IL6
IL7
IL15
IL21

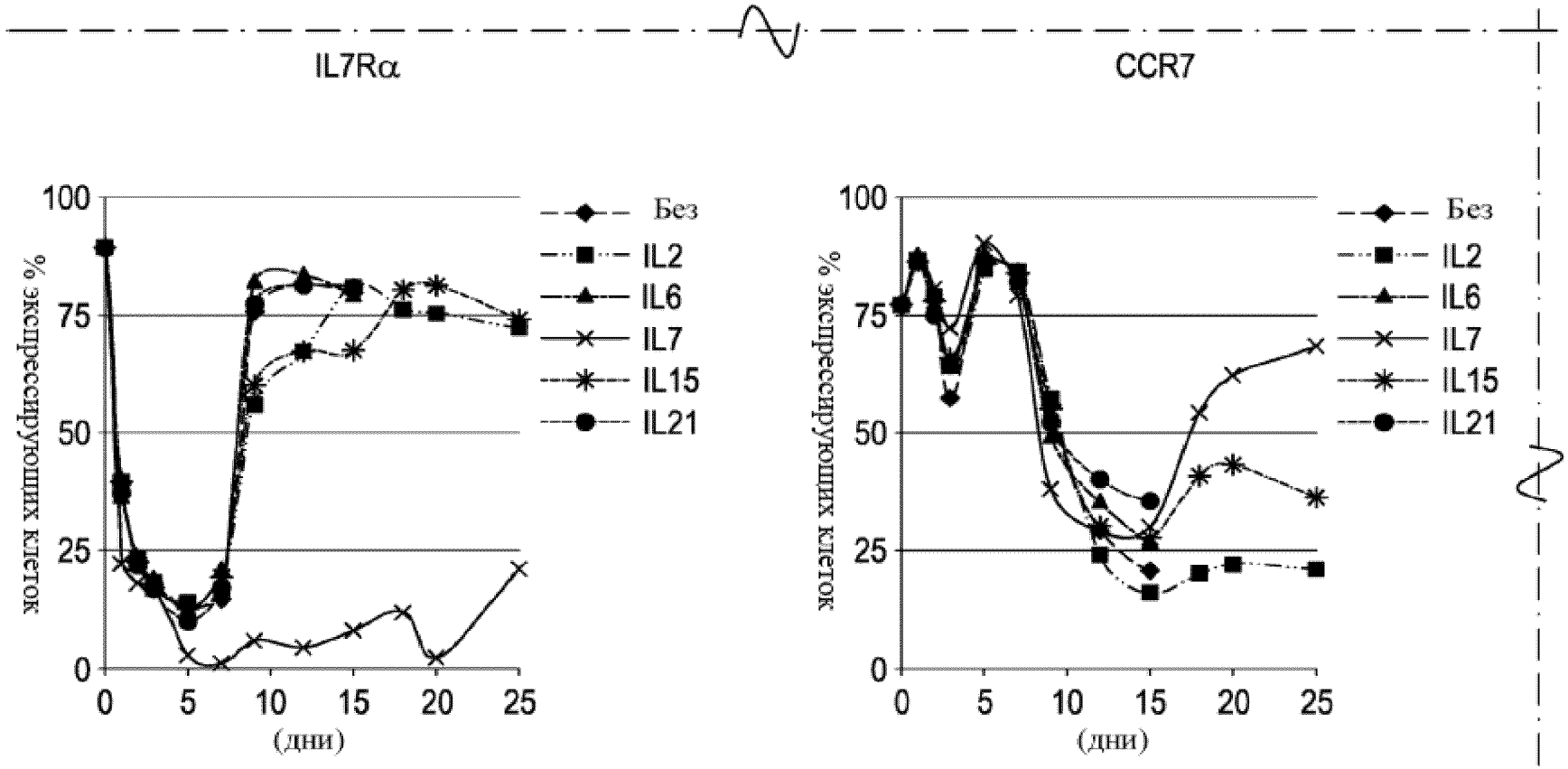
ФИГ. 13В



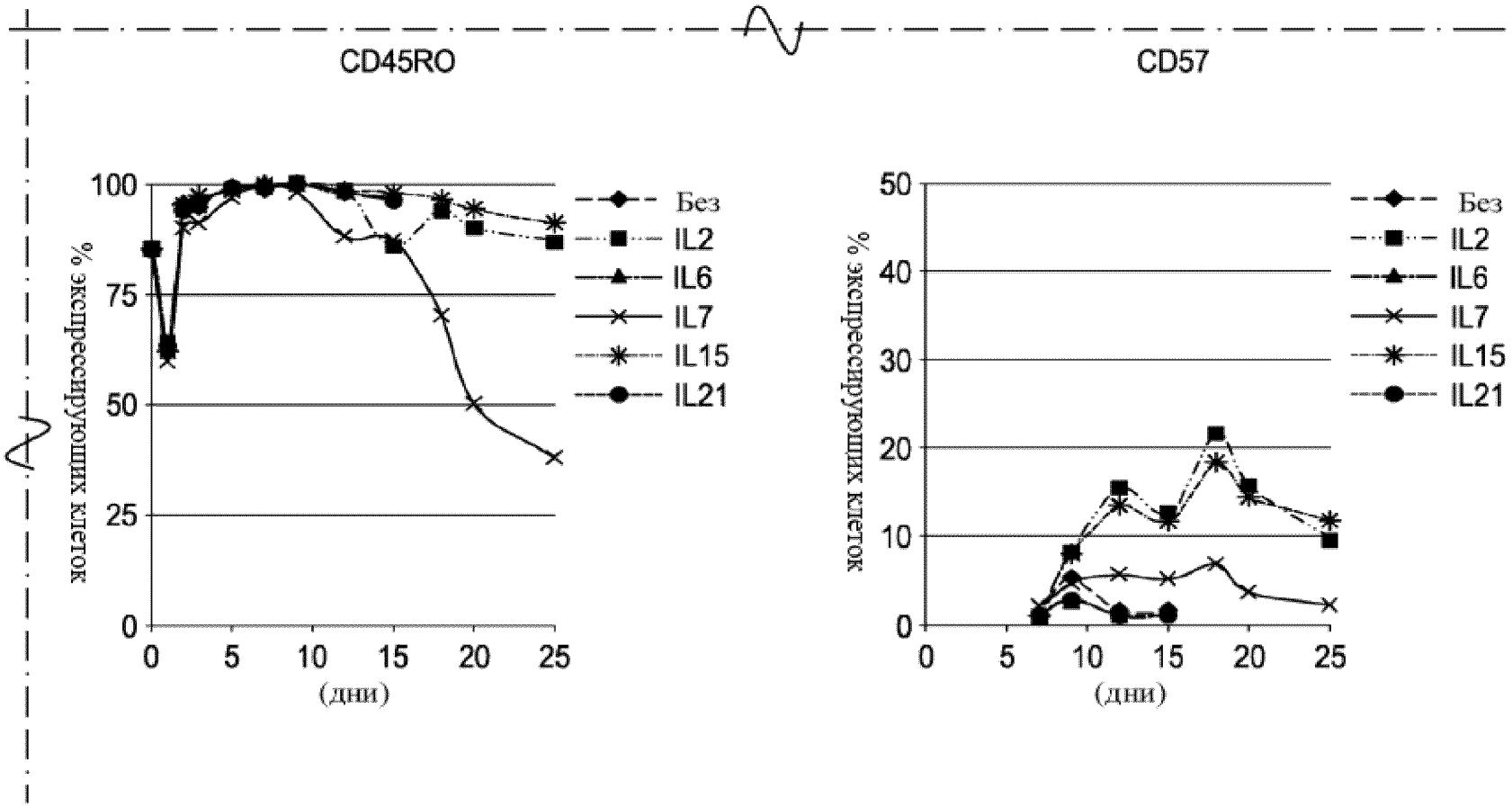
ФИГ. 14 (часть 1)



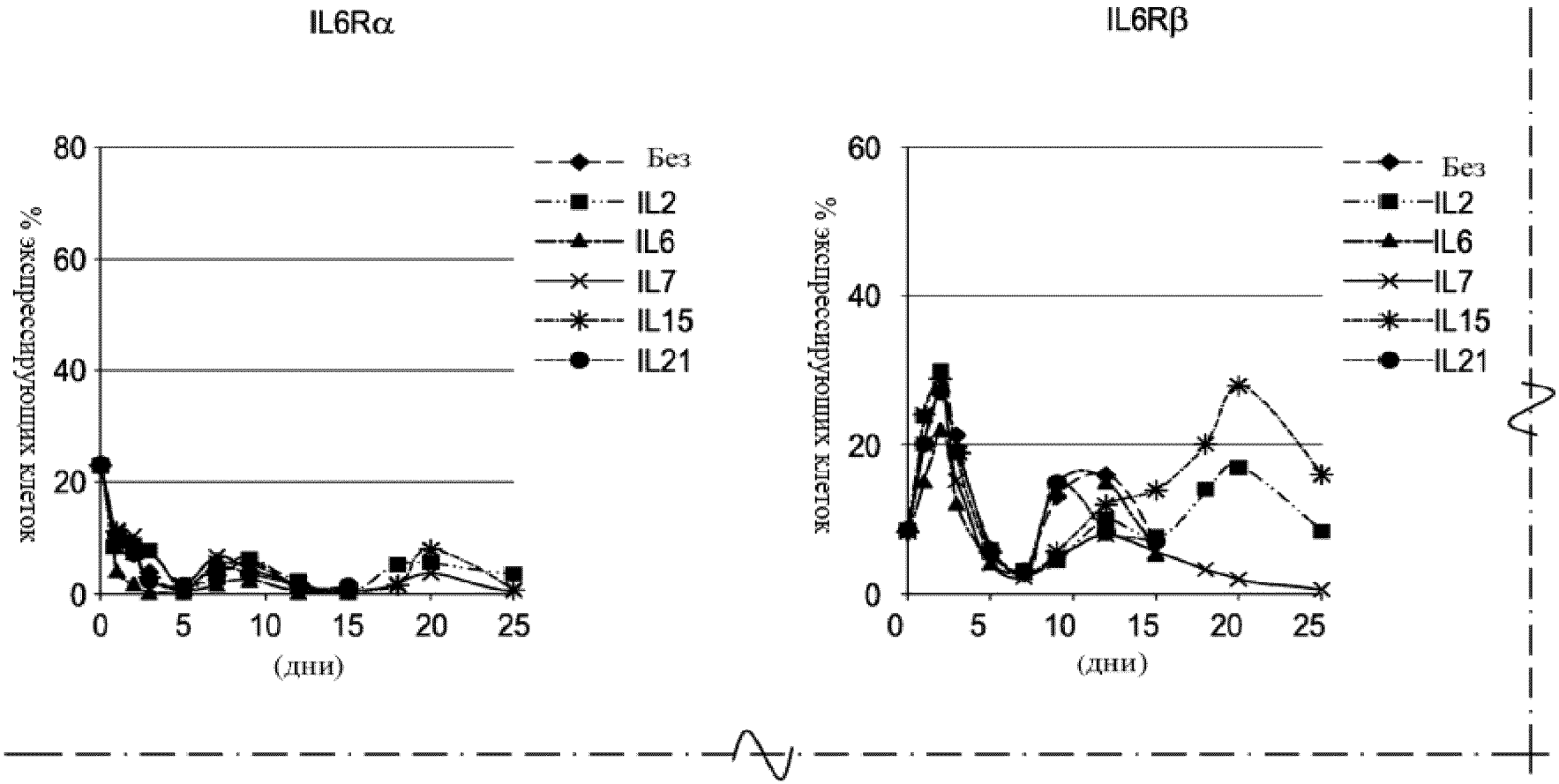
ФИГ. 14 (часть 2)



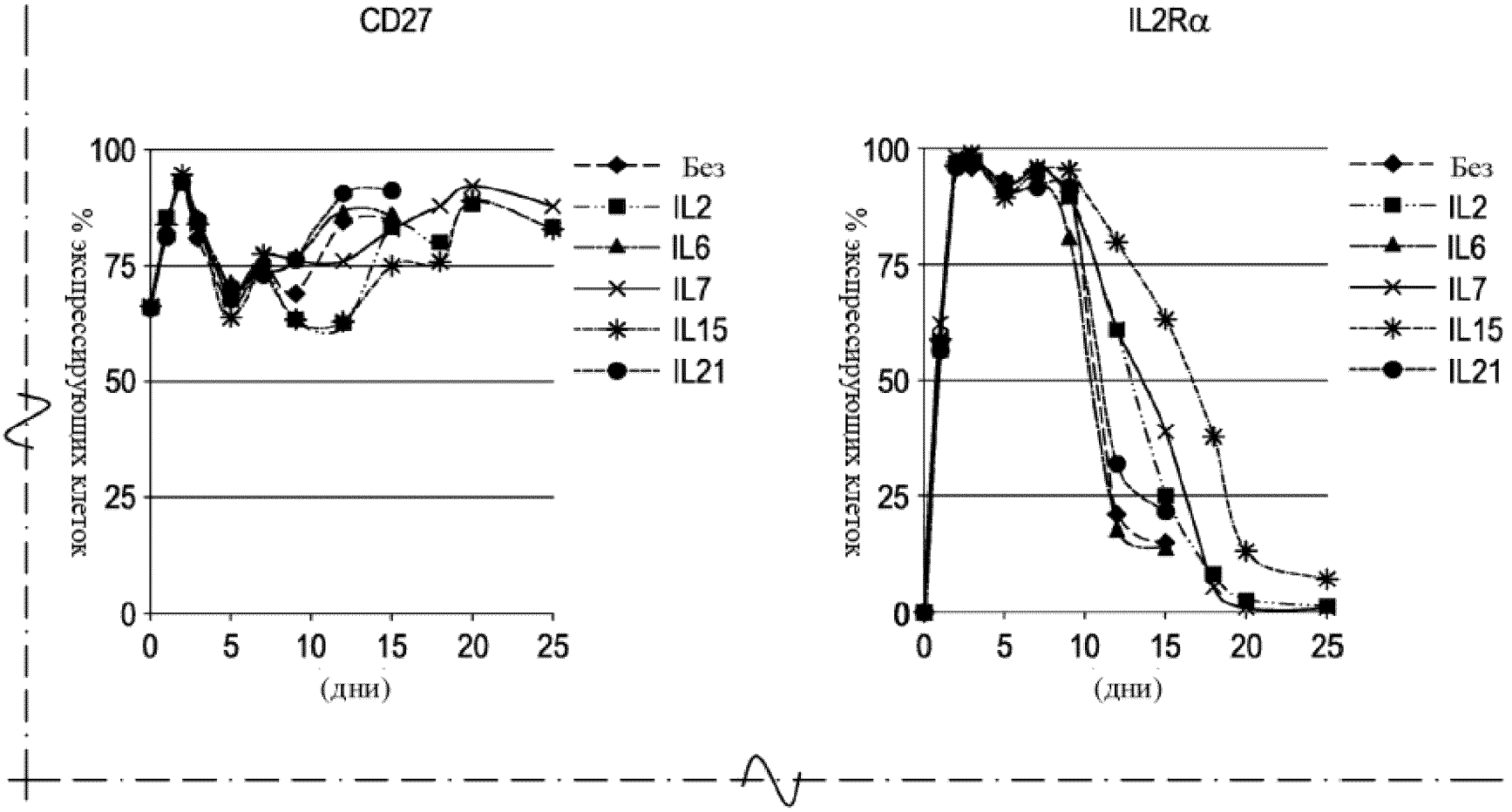
ФИГ. 14 (часть 3)



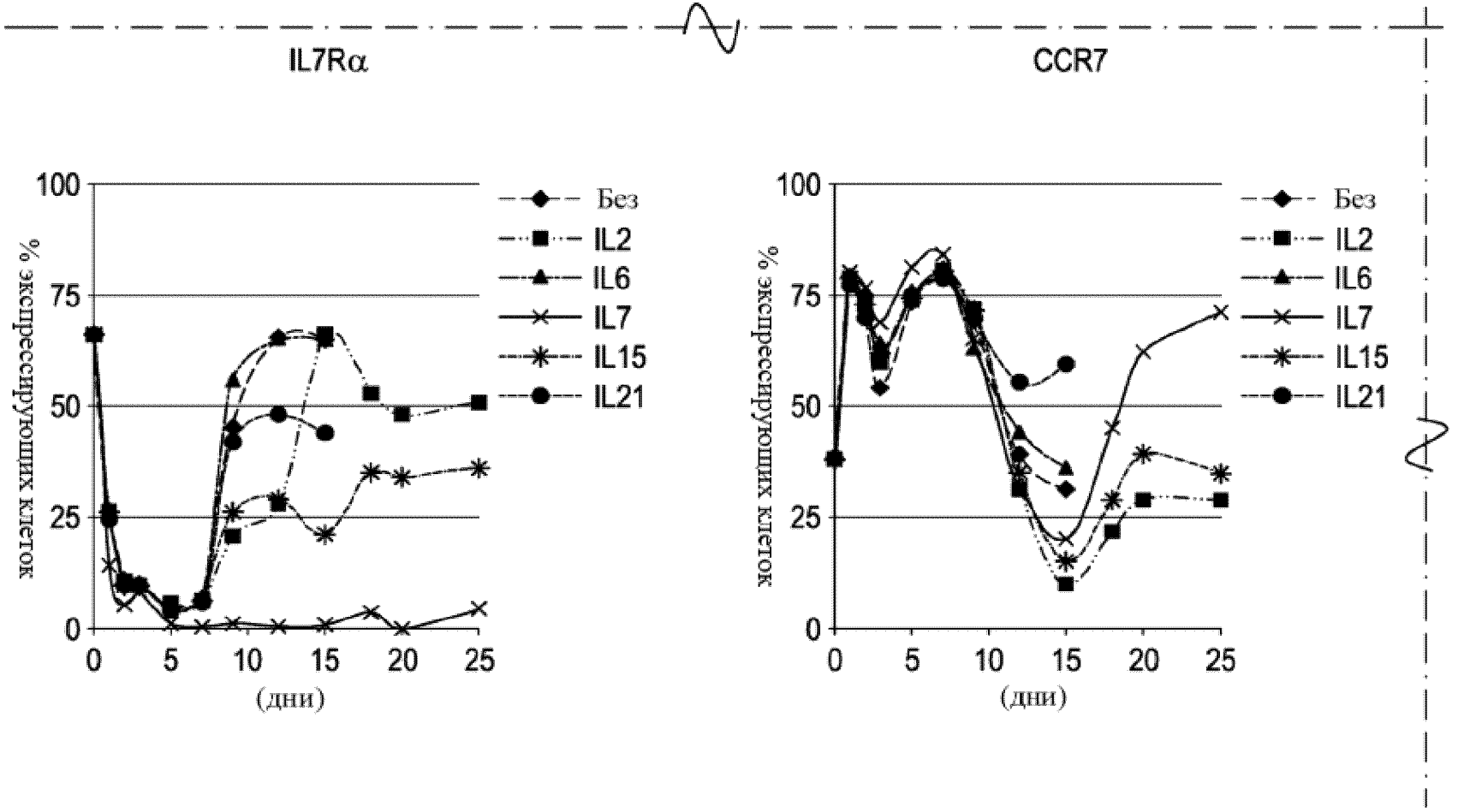
ФИГ. 14 (часть 4)



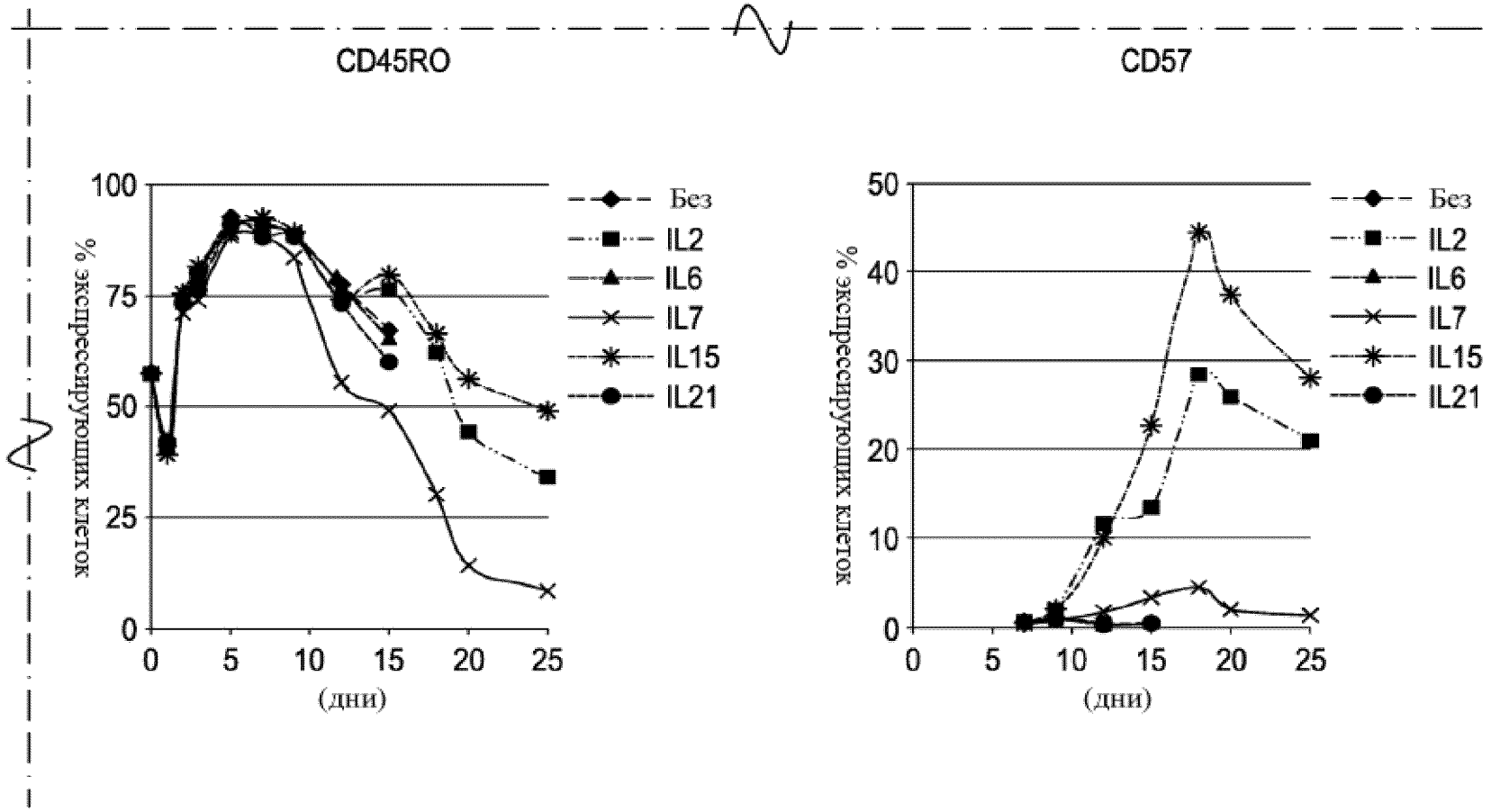
ФИГ. 15 (часть 1)



ФИГ. 15 (часть 2)

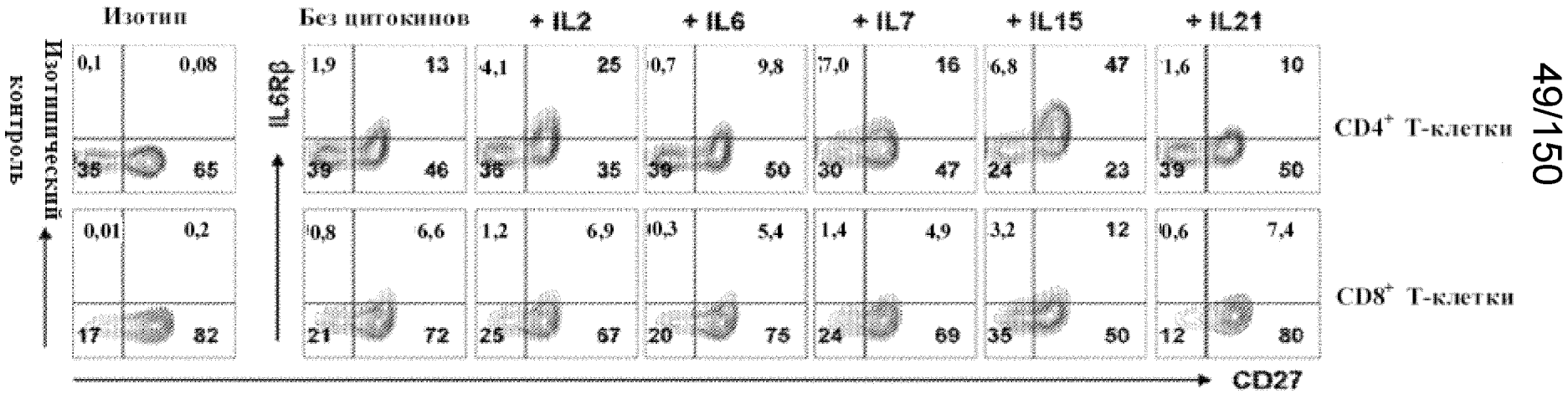


ФИГ. 15 (часть 3)

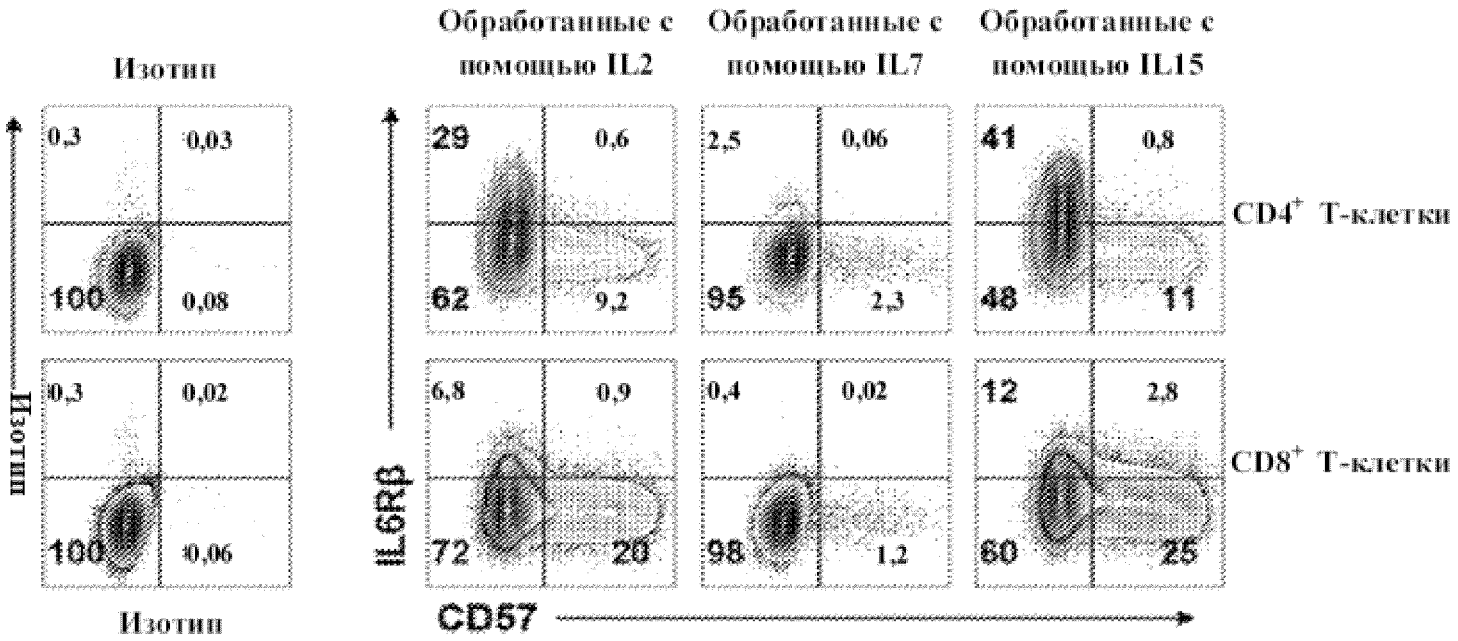


ФИГ. 15 (часть 4)

ФИГ. 16

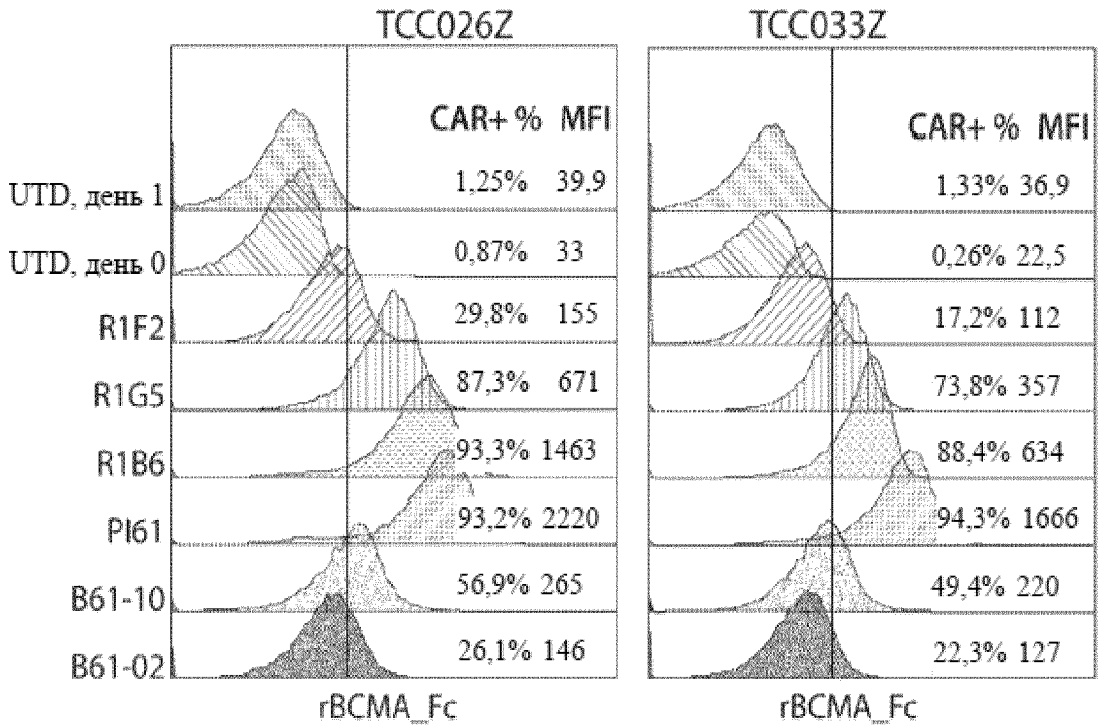

Изотип
Без цитокинов
+ IL2
+ IL6
+ IL7
+ IL15
+ IL21
Изотипический контроль
IL6Rβ
0,1
0,08
35
65
1,9
13
39
46
4,1
25
35
35
0,7
9,8
39
50
7,0
16
30
47
6,8
47
24
23
1,6
10
39
50
CD4+ Т-клетки
0,01
0,2
17
82
0,8
6,6
21
72
1,2
6,9
25
67
0,3
5,4
20
75
1,4
4,9
24
69
3,2
12
35
50
0,6
7,4
12
80
CD8+ Т-клетки
CD27

ФИГ. 17


Изотип
Обработанные с помощью IL2
Обработанные с помощью IL7
Обработанные с помощью IL15
0,3
0,03
100
0,08
29
0,6
62
9,2
2,5
0,06
95
2,3
41
0,8
48
11
CD4+ Т-клетки
0,3
0,02
100
0,06
6,8
0,9
72
20
0,4
0,02
98
1,2
12
2,8
60
25
CD8+ Т-клетки
Изотип
IL6Rβ
CD57

ФИГ. 18

IL2+
IFNγ+
TNFα+
IL2+IFNγ+
IFNγ+TNFα+
TNFα+IL2+
IL2+IFNγ+TNFα+
% экспрессирующих клеток
CD4
CD8
Клетки, обработанные IL2
Клетки, обработанные IL7
Клетки, обработанные IL15

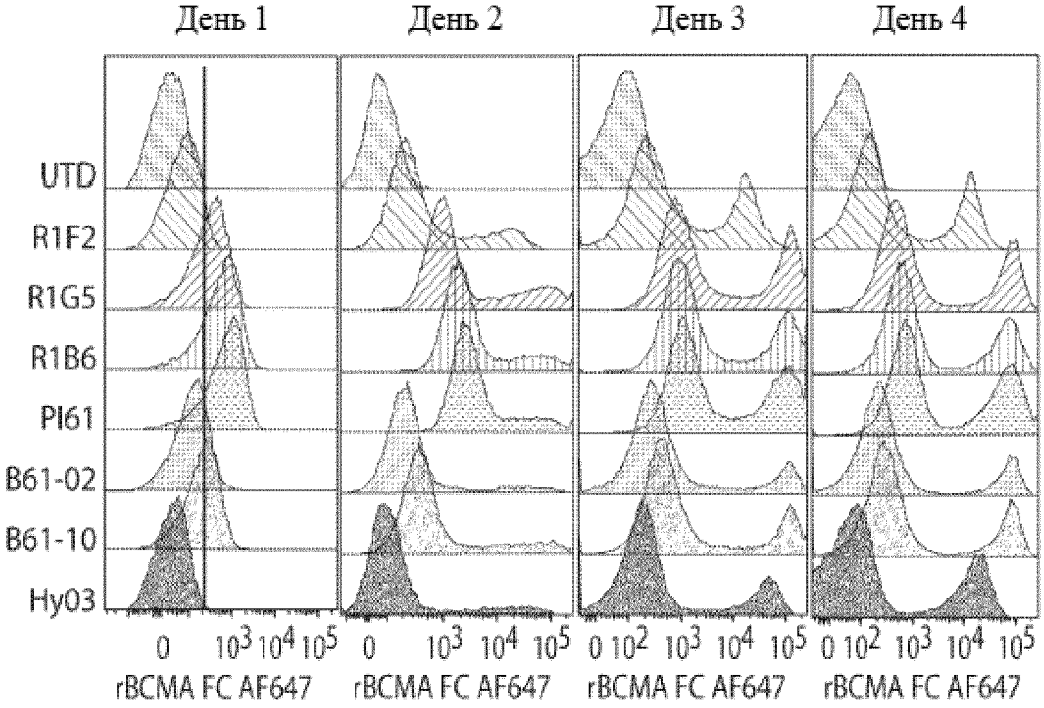

TCC026Z
TCC033Z
CAR+ % MFI
CAR+ % MFI
UTD, день 1
1,25% 39,9
1,33% 36,9
UTD, день 0
0,87% 33
0,26% 22,5
R1F2
29,8% 155
17,2% 112
R1G5
87,3% 671
73,8% 357
R1B6
93,3% 1463
88,4% 634
PI61
93,2% 2220
94,3% 1666
B61-10
56,9% 265
49,4% 220
B61-02
26,1% 146
22,3% 127
rBCMA_Fc
rBCMA_Fc

ФИГ. 19A

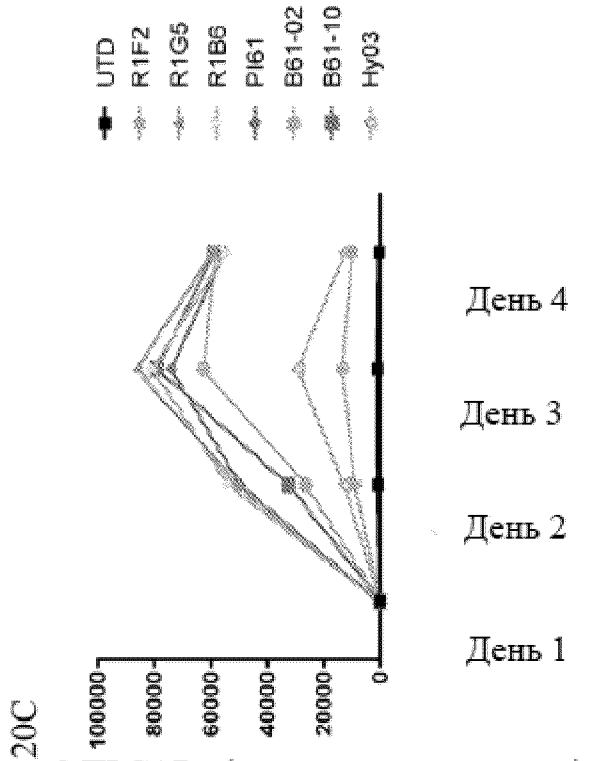
ФИГ. 19B

Панель для FACS

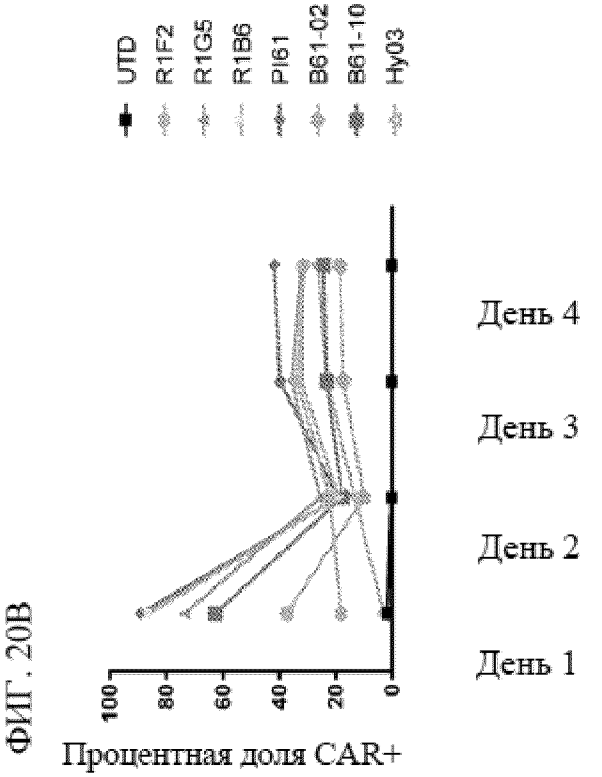
Краситель	Разведение	Напряжение
FSC		430
SSC		255
BUV395 для CD3	1/200	330
PerCP Cy5.5 для CD4	1/100	430
Alexa 647 для rBCMA	1/380 (3 мкг/мл)	440
APC H7 для CD8	1/200	490
LIVE/DEAD Aqua	1/500	400


День 1
День 2
День 3
День 4
UTD
R1F2
R1G5
R1B6
PI61
B61-02
B61-10
Hy03
0 10^3 10^4 10^5
rBCMA FC AF647
0 10^3 10^4 10^5
rBCMA FC AF647
0 10^2 10^3 10^4 10^5
rBCMA FC AF647
0 10^2 10^3 10^4 10^5
rBCMA FC AF647

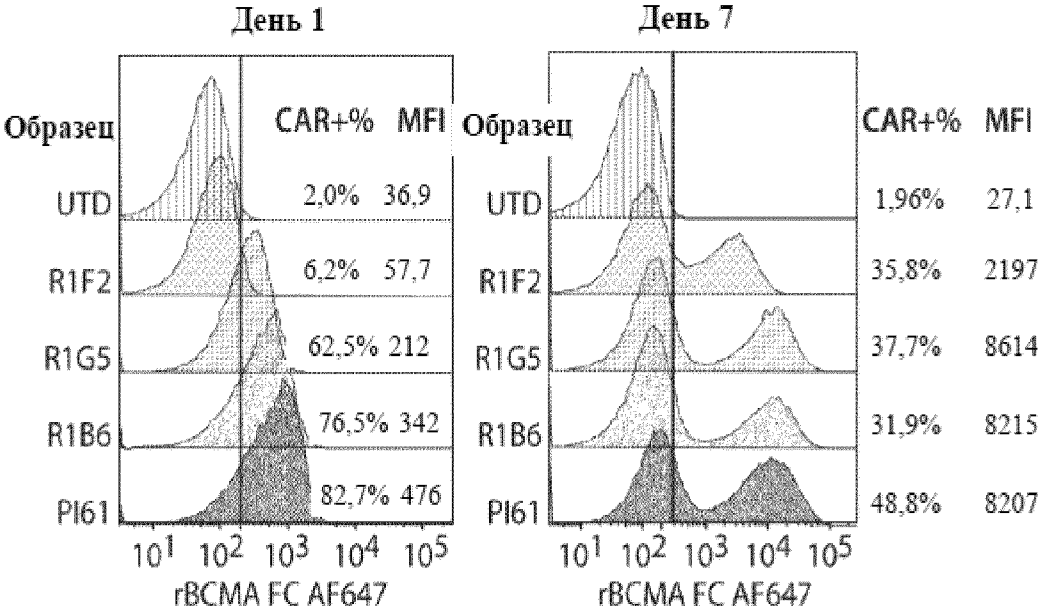
ФИГ. 20А



ФИГ. 20C

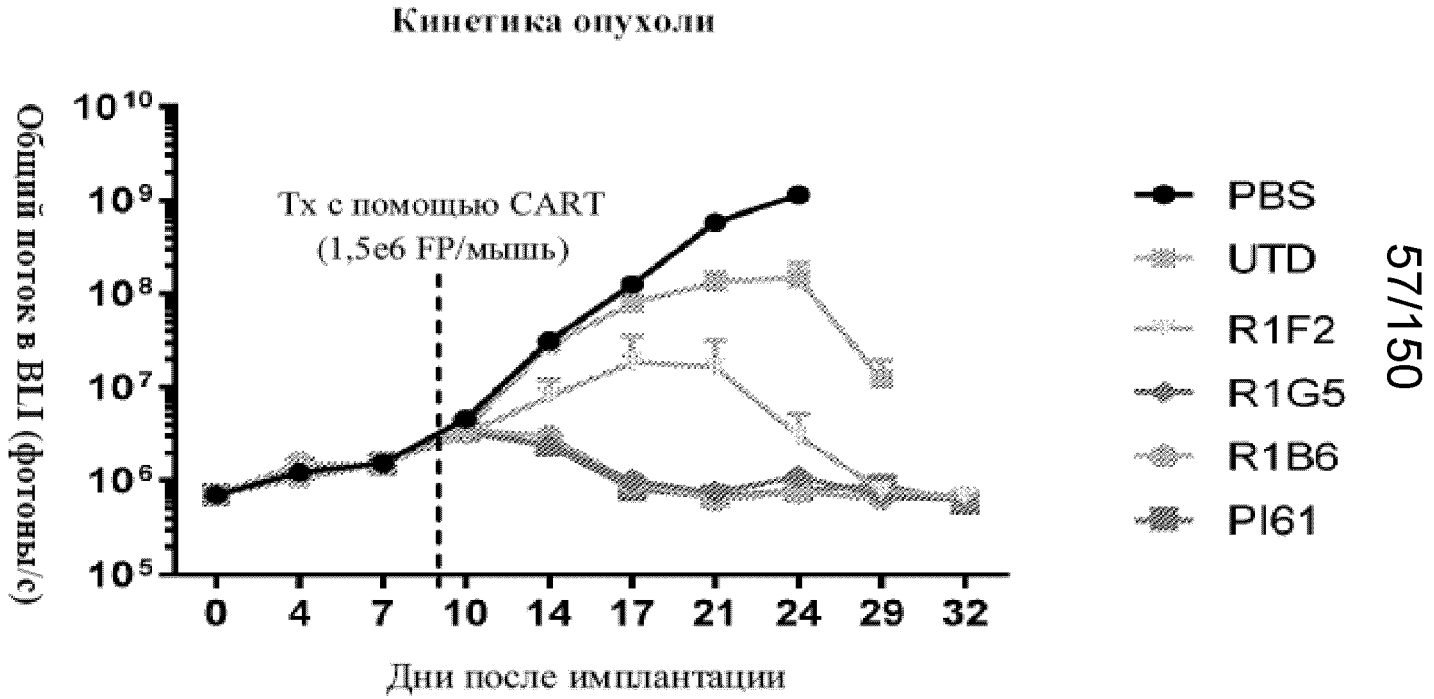


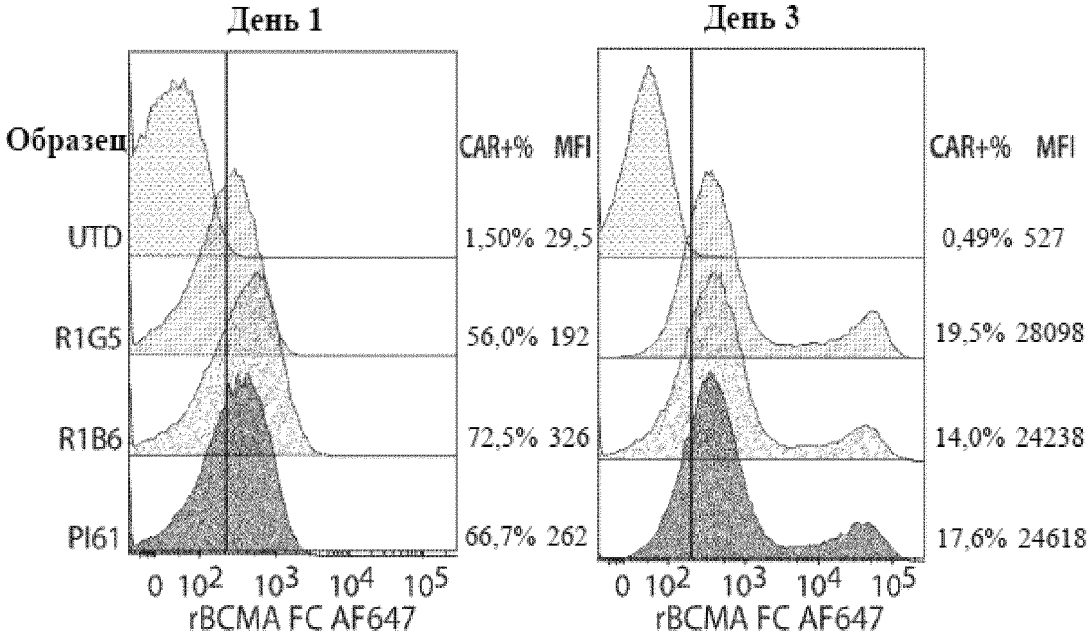
ФИГ. 20B


День 1
День 7
Образец
CAR+%
MFI
UTD
R1F2
R1G5
R1B6
PI61
2,0% 36,9
6,2% 57,7
62,5% 212
76,5% 342
82,7% 476
1,96% 27,1
35,8% 2197
37,7% 8614
31,9% 8215
48,8% 8207
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
rBCMA FC AF647

ФИГ. 21A

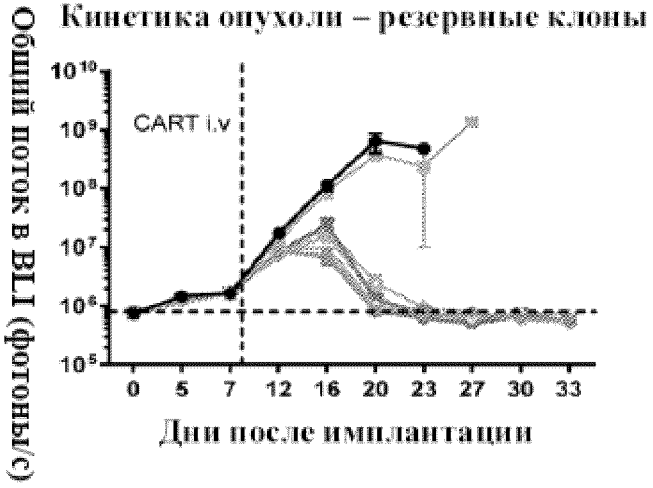
ФИГ. 21B


Кинетика опухоли
Общий поток в BLI (фотоны/с)
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
Tx с помощью CART
(1,5e6 FP/мышь)
0
4
7
10
14
17
21
24
29
32
Дни после имплантации
PBS
UTD
R1F2
R1G5
R1B6
PI61

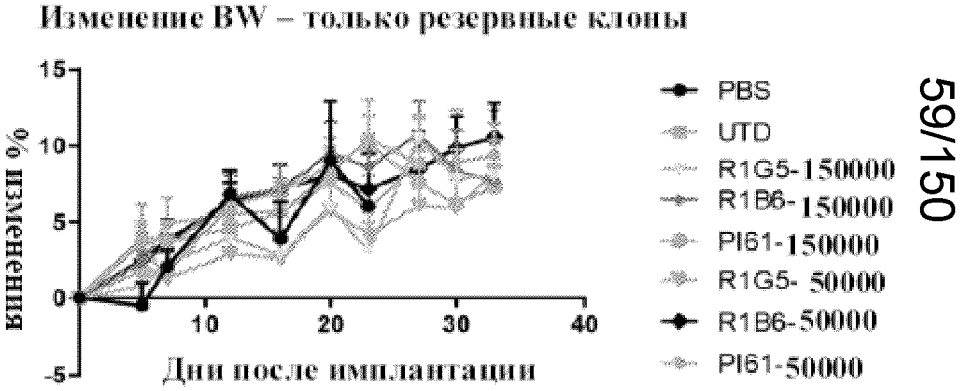

День 1
День 3
Образец
CAR+%
MFI
UTD
1,50%
29,5
0,49%
527
R1G5
56,0%
192
19,5%
28098
R1B6
72,5%
326
14,0%
24238
PI61
66,7%
262
17,6%
24618
0
10^2
10^3
10^4
10^5
rBCMA FC AF647

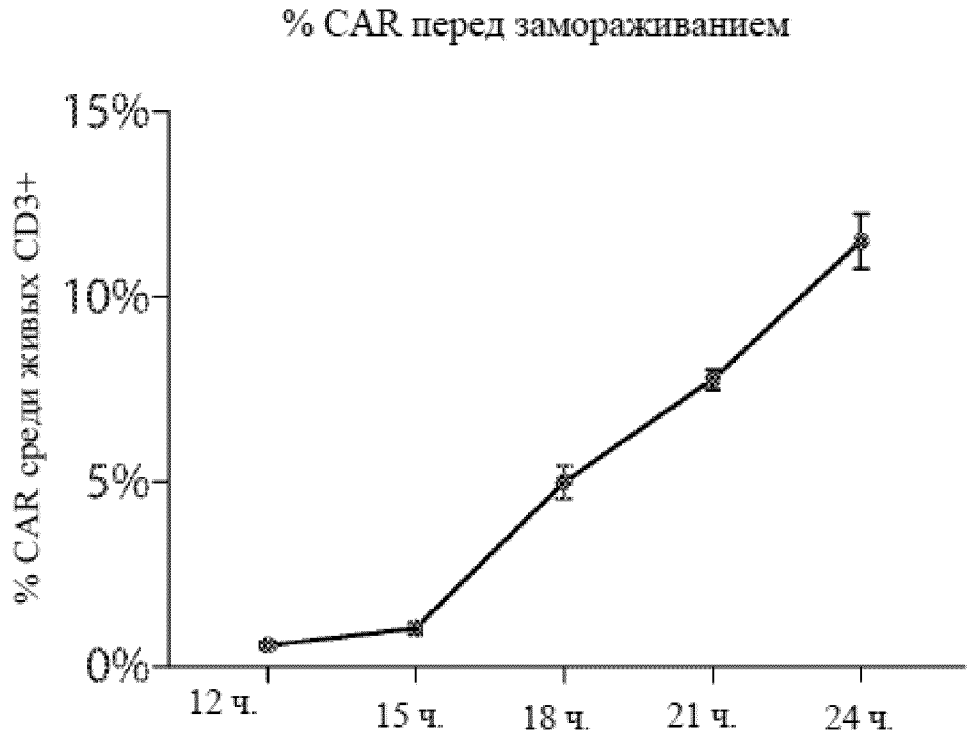
ФИГ. 22А

ФИГ. 22B



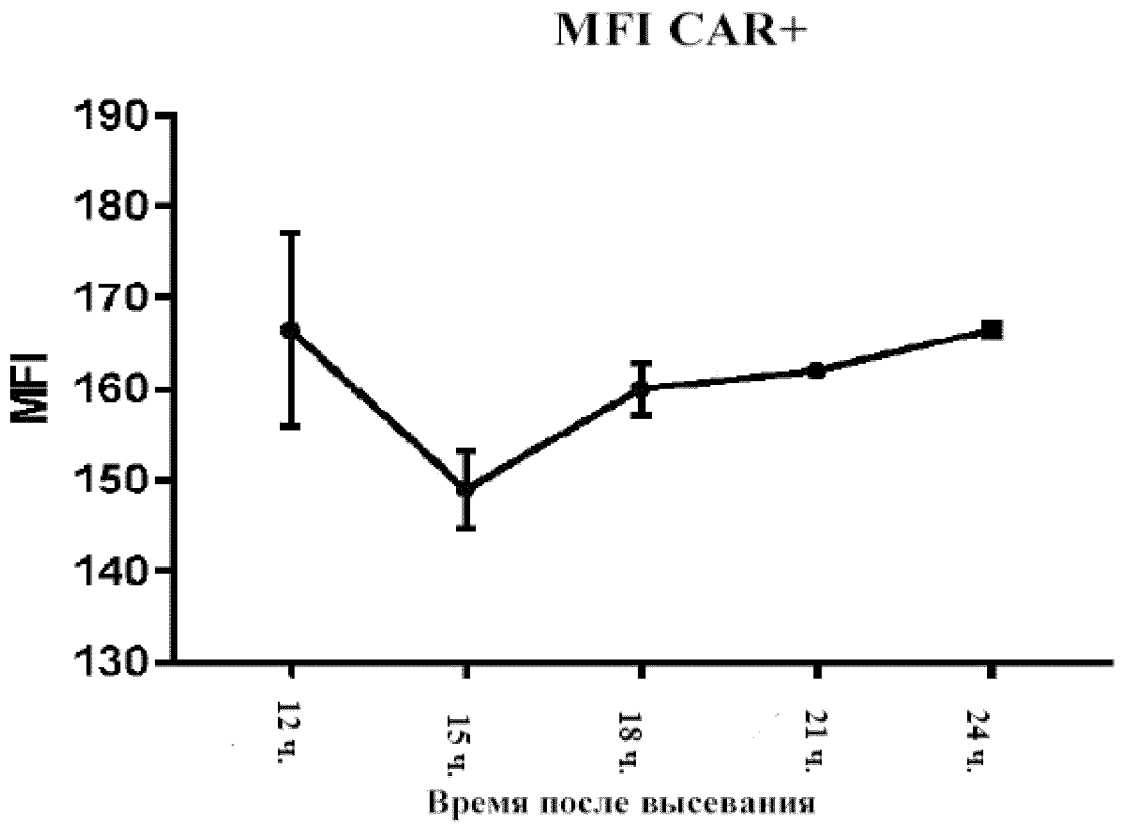
ФИГ. 22C

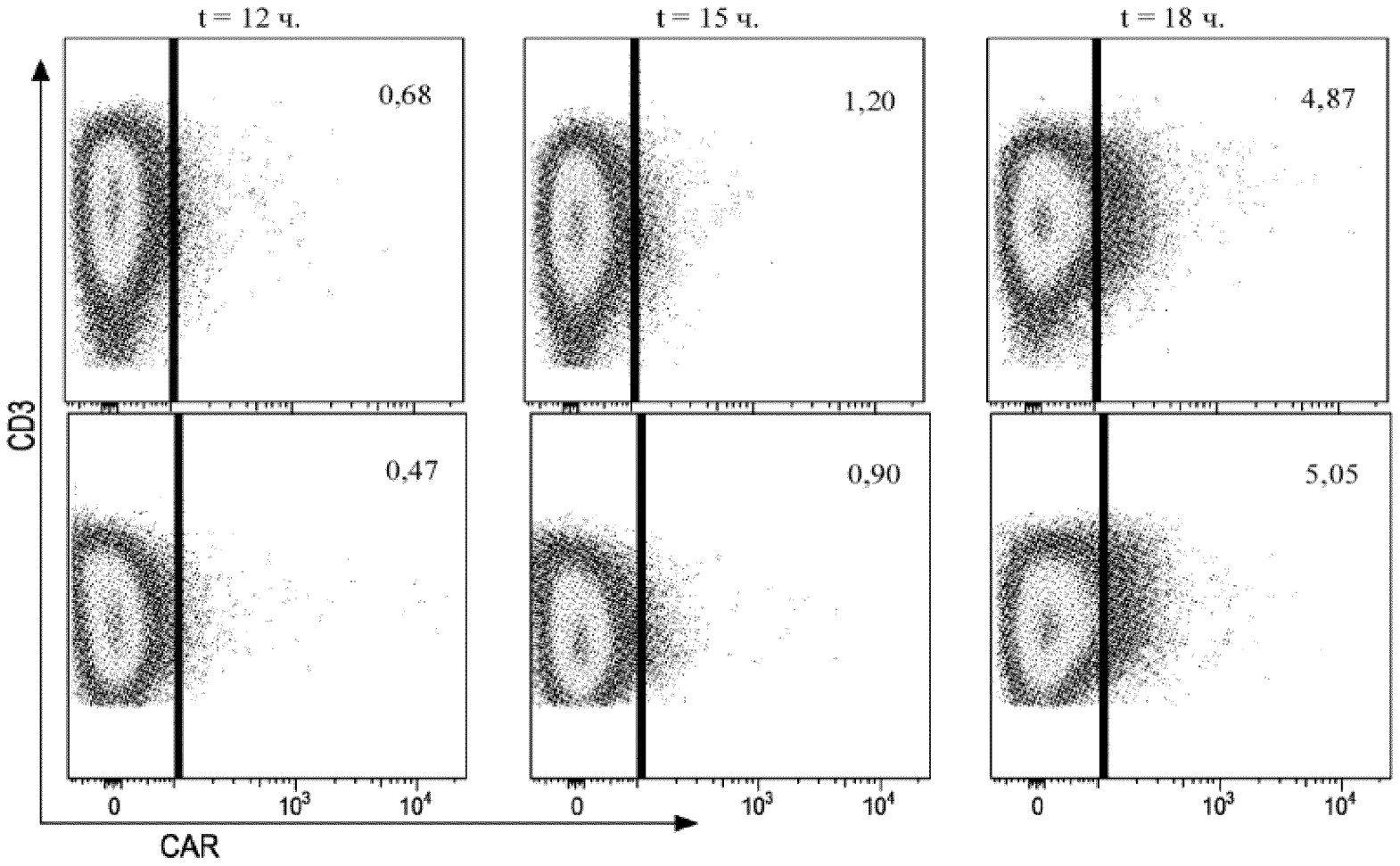



% CAR перед замораживанием
% CAR среди живых CD3+
15%
10%
5%
0%
12 ч.
15 ч.
18 ч.
21 ч.
24 ч.
Время после высевания

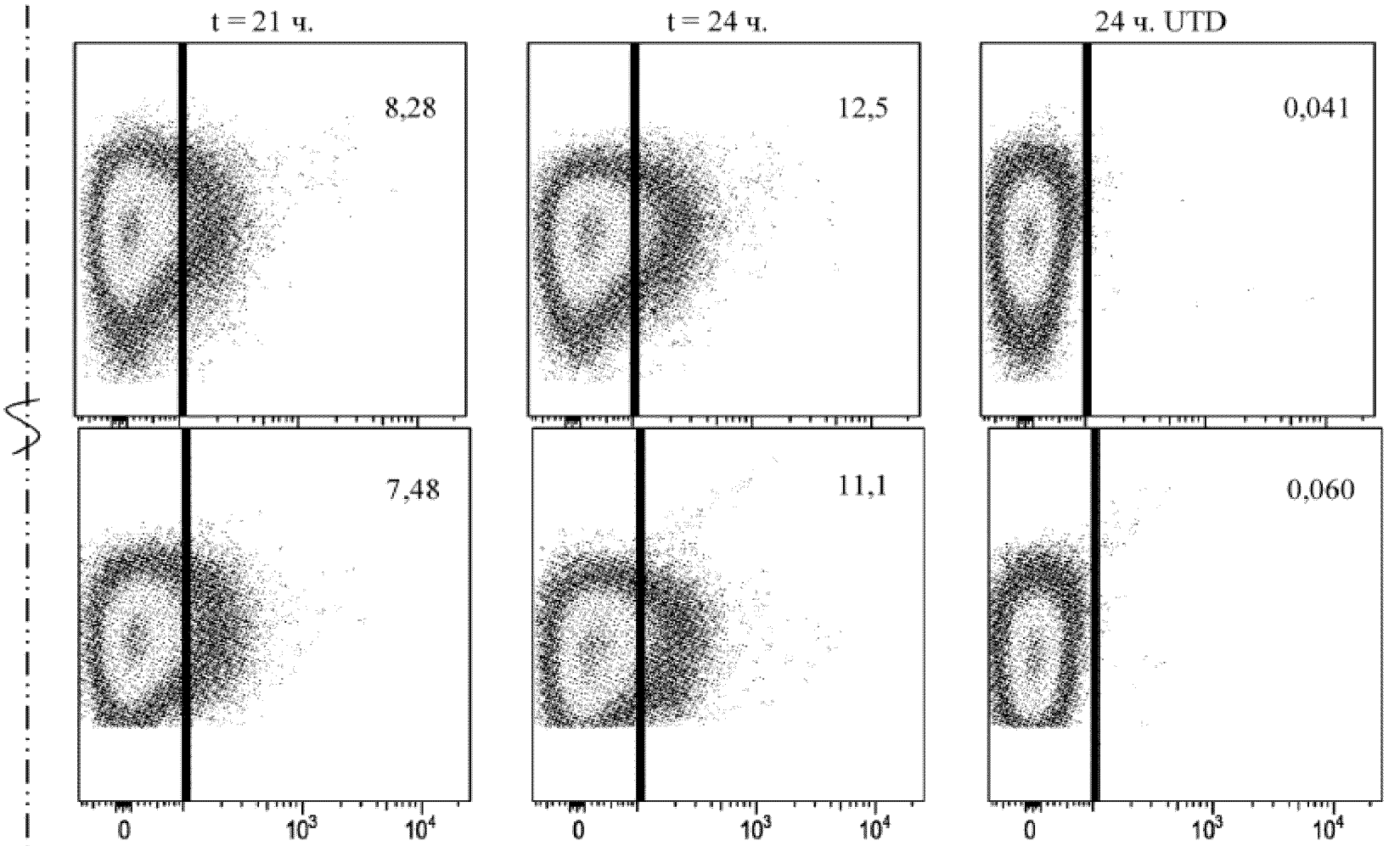
ФИГ. 23A

ФИГ. 23B


MFI CAR+
MFI
190
180
170
160
150
140
130
12 ч.
15 ч.
18 ч.
21 ч.
24 ч.
Время после высевания



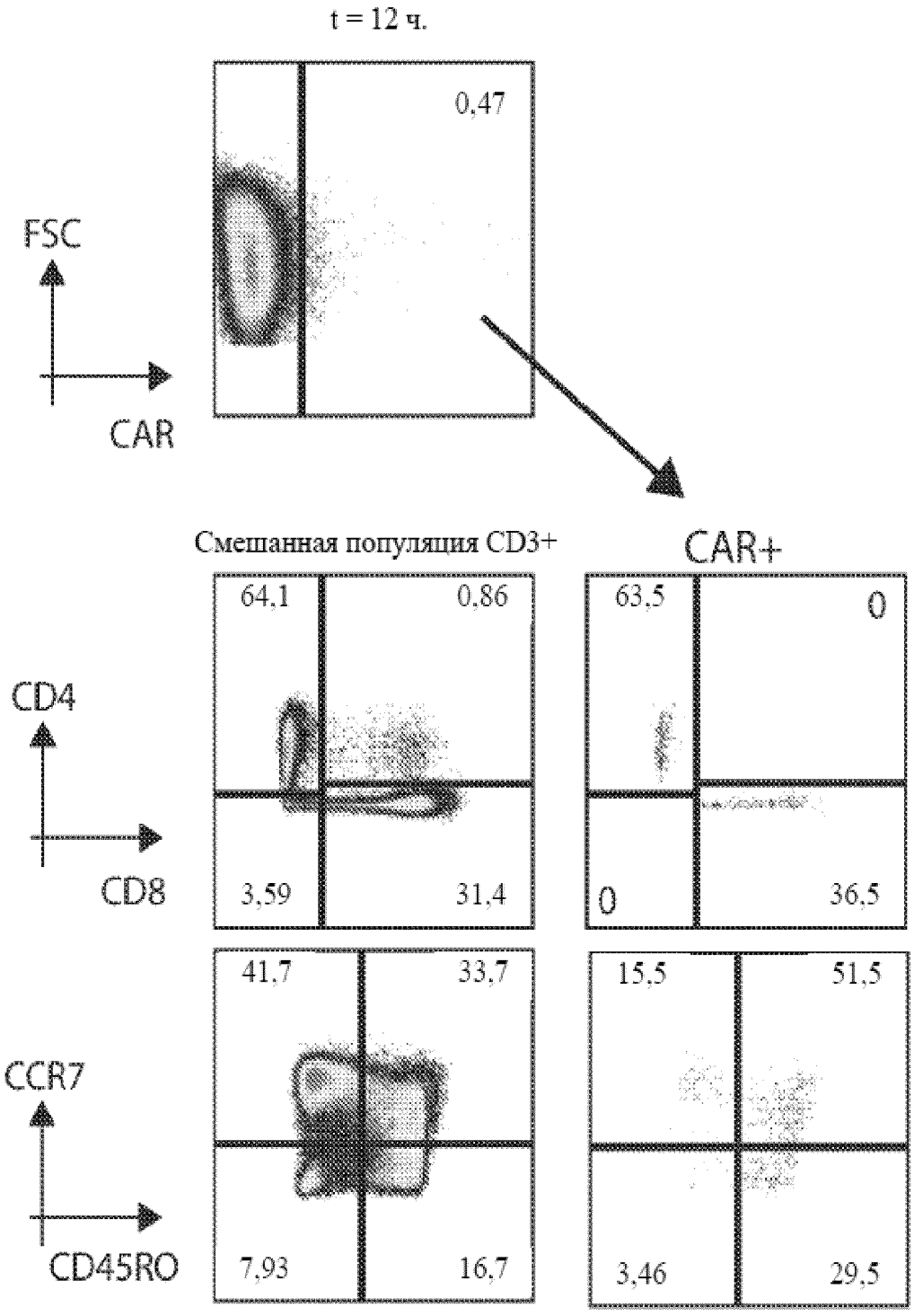
ФИГ. 23C (часть 1)



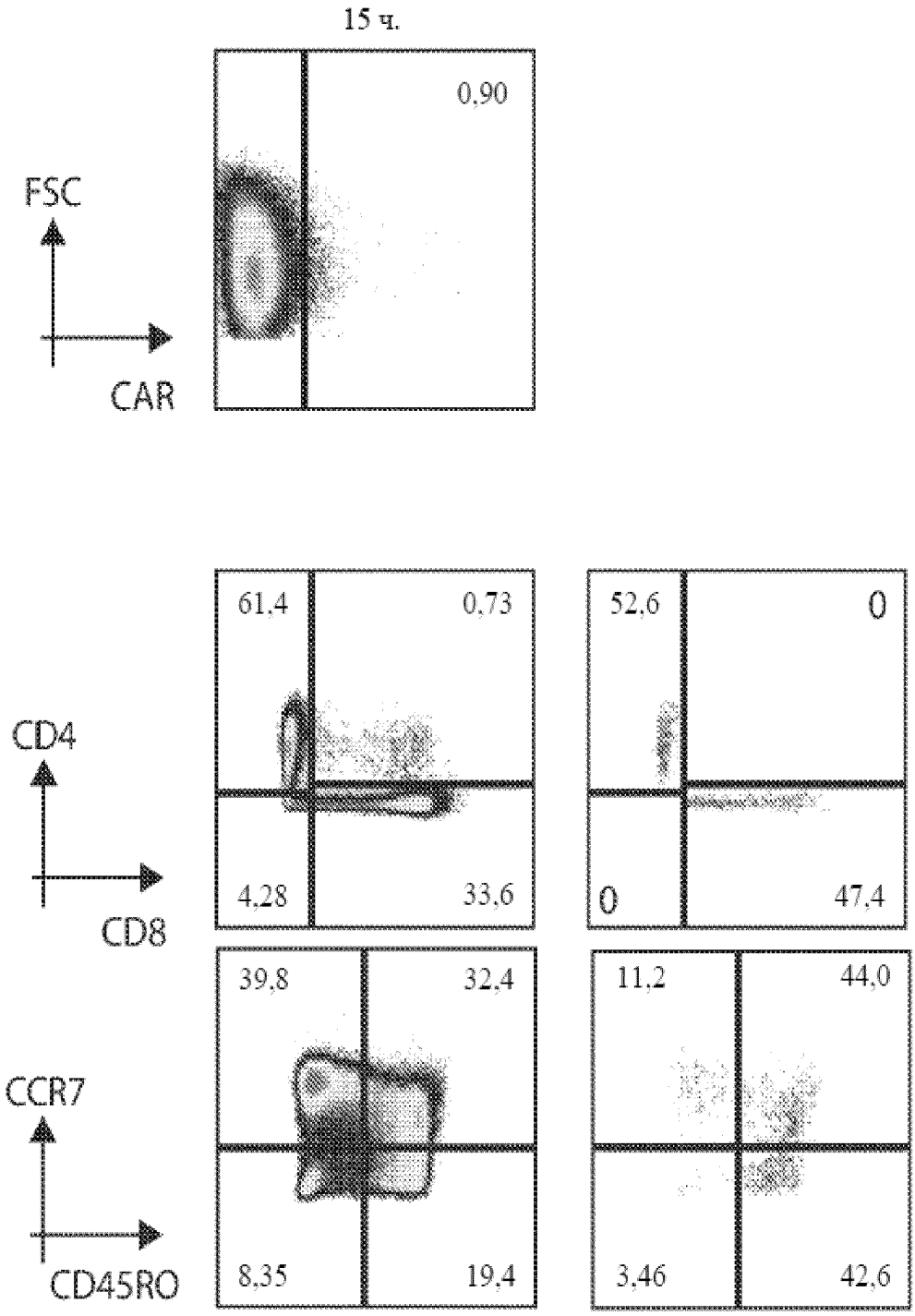
ФИГ. 23C (часть 2)


Смешанная популяция CAR+
% живых CD3+ или CD3+ CAR+
100%
50%
0%
Продукт, полученный с помощью Prodigy
12 ч.
15 ч.
18 ч.
21 ч.
24 ч.
24 ч. UTD
День 0
Время после высевания
8eff
4eff
8em
4em
8cm
4cm
8n
4n
% CD4
CD45RO−CCR7−
CD45RO+CCR7−
CD45RO+CCR7+
CD45RO−CCR7+

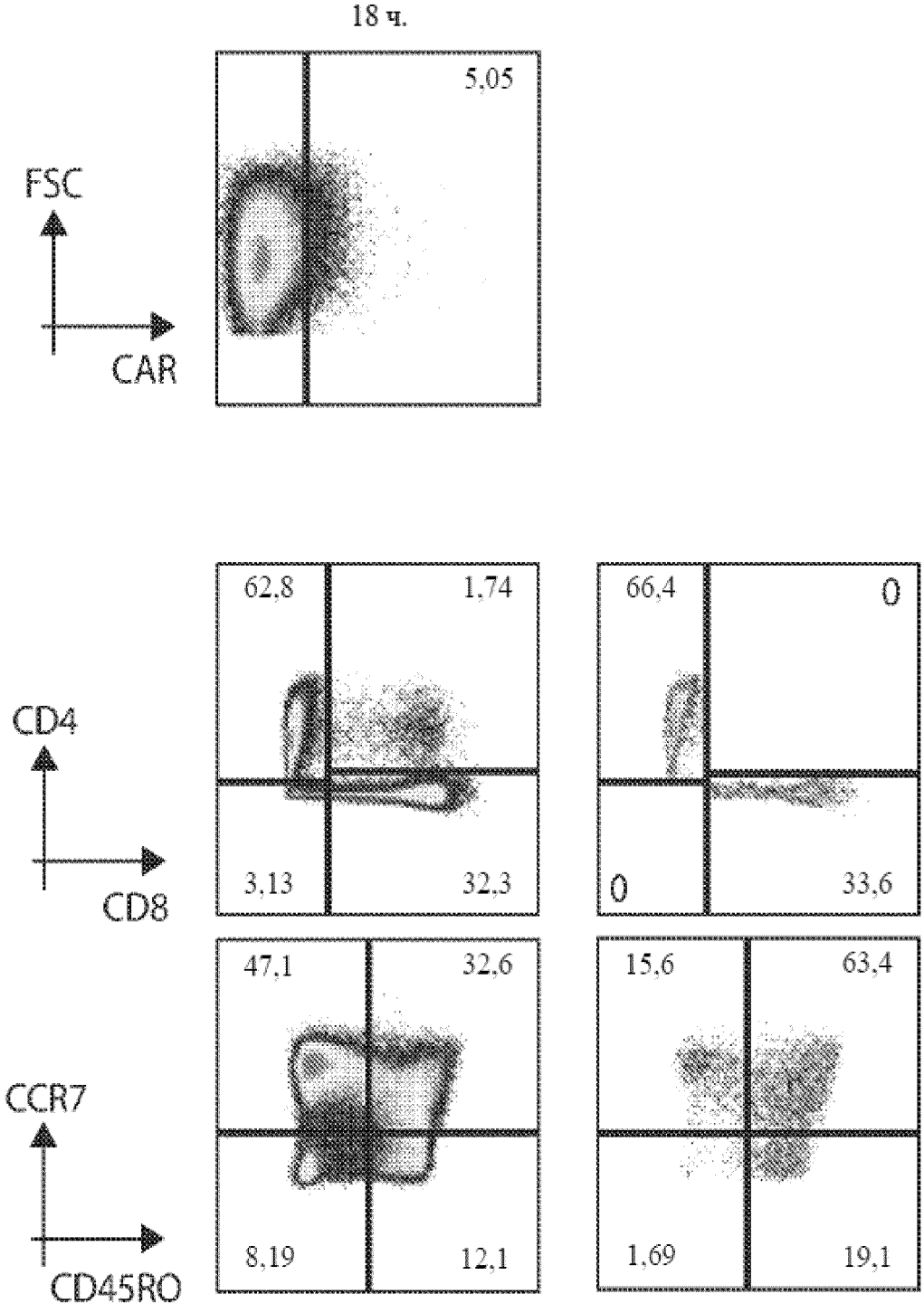
ФИГ. 24A


t = 12 ч.
0,47
FSC
CAR
Смешанная популяция CD3+
CAR+
64,1
0,86
63,5
0
CD4
CD8
3,59
31,4
0
36,5
41,7
33,7
15,5
51,5
CCR7
CD45RO
7,93
16,7
3,46
29,5

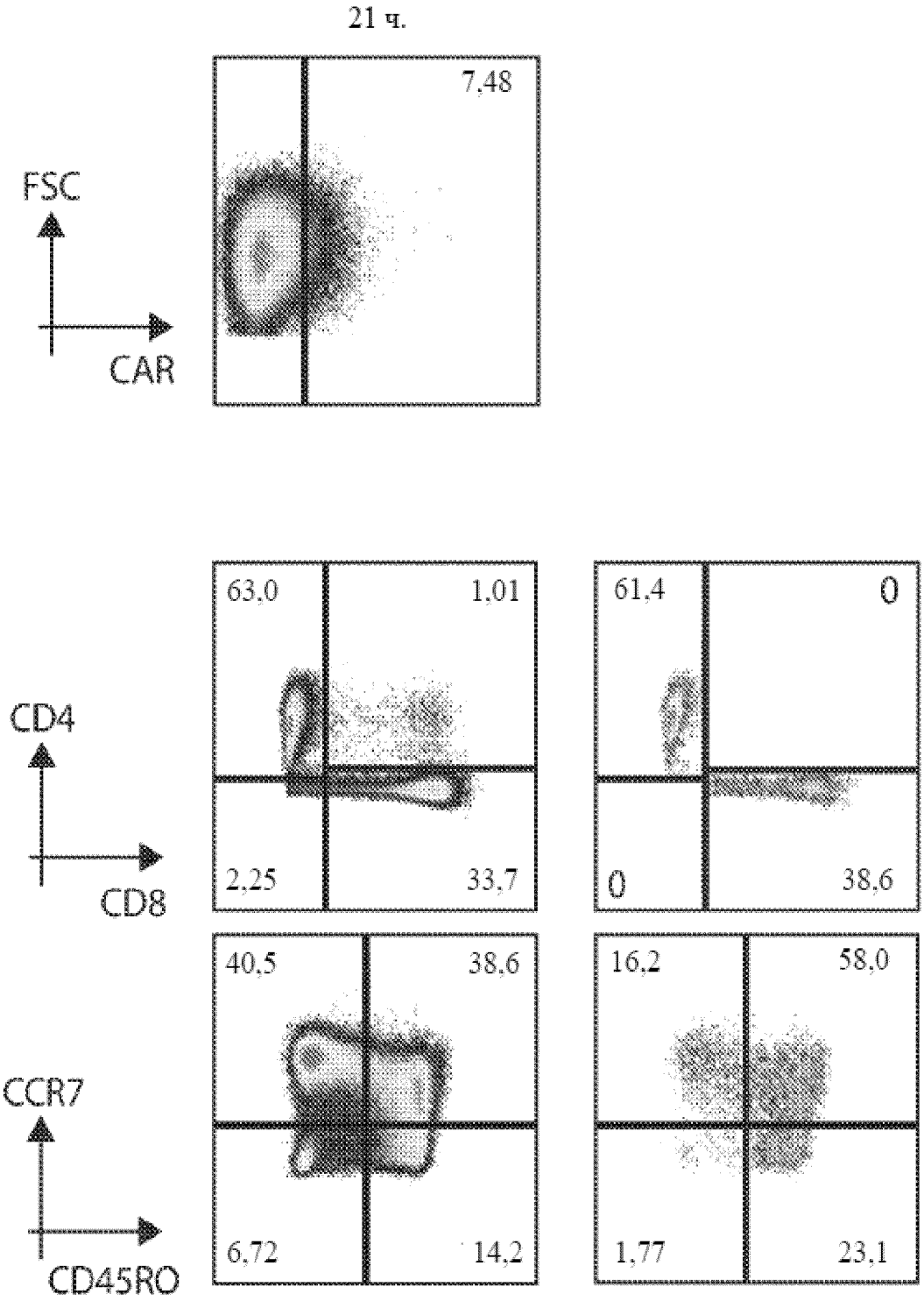
ФИГ. 24B-1


15 ч.
0,90
FSC
CAR
61,4
0,73
4,28
33,6
52,6
0
0
47,4
CD4
CD8
39,8
32,4
8,35
19,4
11,2
44,0
3,46
42,6
CCR7
CD45RO

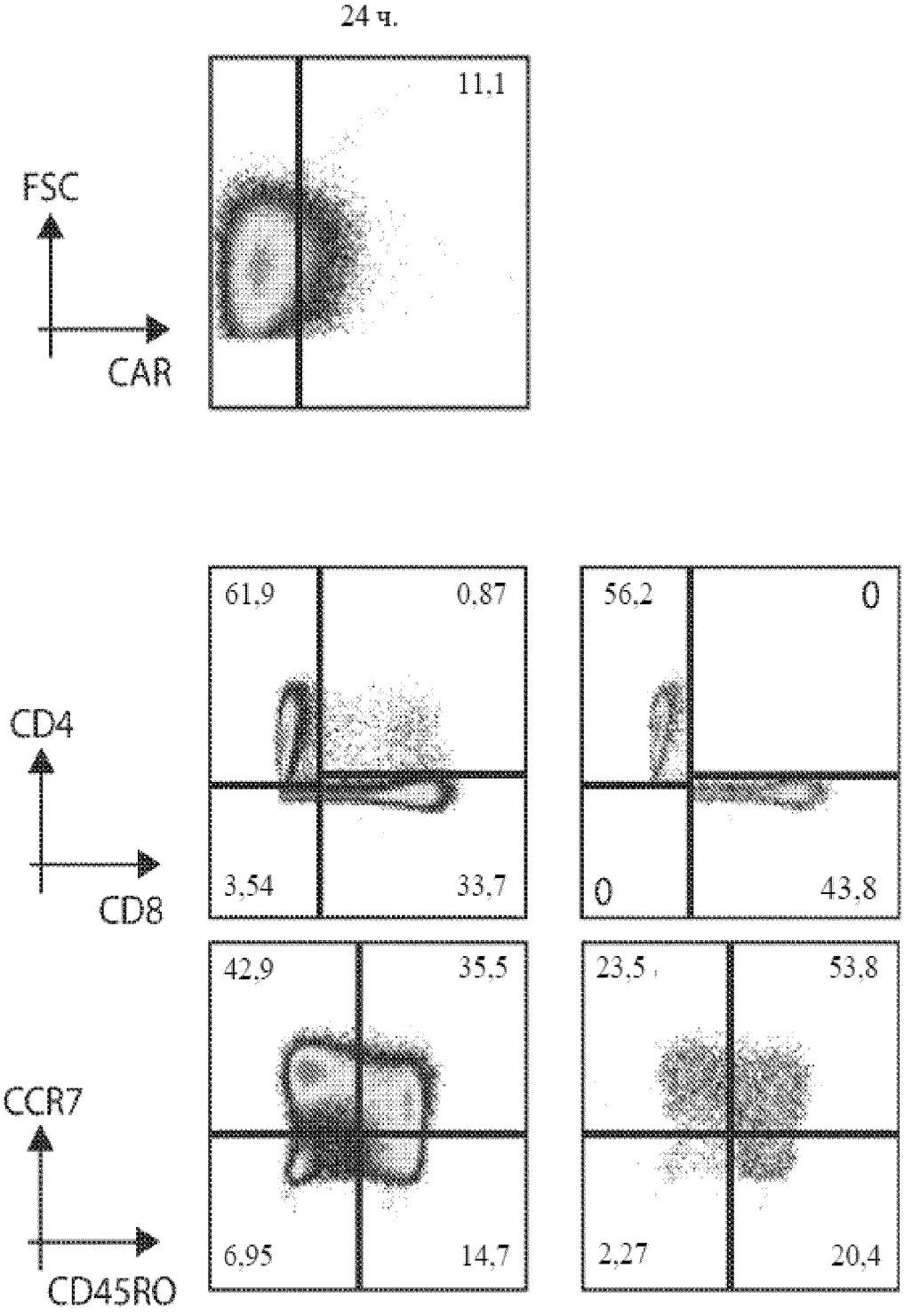
ФИГ. 24В-2


18 ч.
5,05
FSC
CAR
62,8
1,74
3,13
32,3
66,4
0
0
33,6
CD4
CD8
47,1
32,6
8,19
12,1
15,6
63,4
1,69
19,1
CCR7
CD45RO

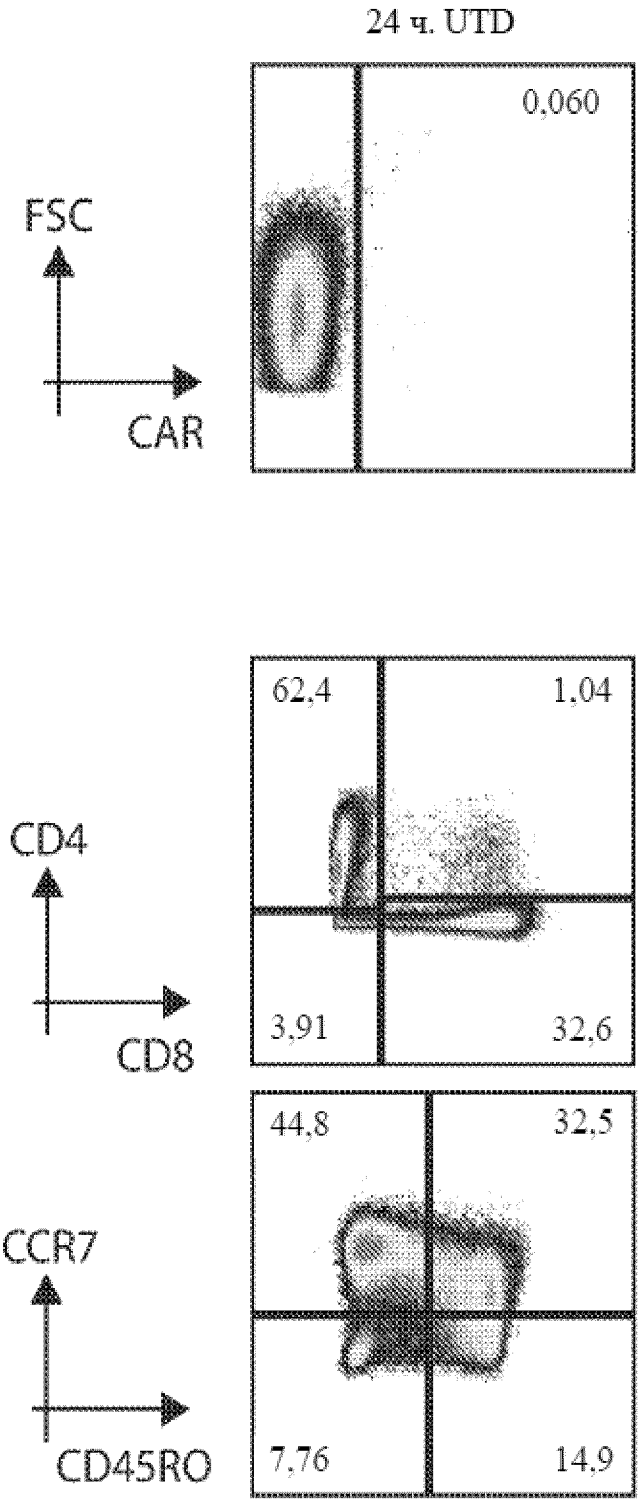
ФИГ. 24В-3


21 ч.
7,48
FSC
CAR
63,0
1,01
2,25
33,7
61,4
0
0
38,6
CD4
CD8
40,5
38,6
6,72
14,2
16,2
58,0
1,77
23,1
CCR7
CD45RO

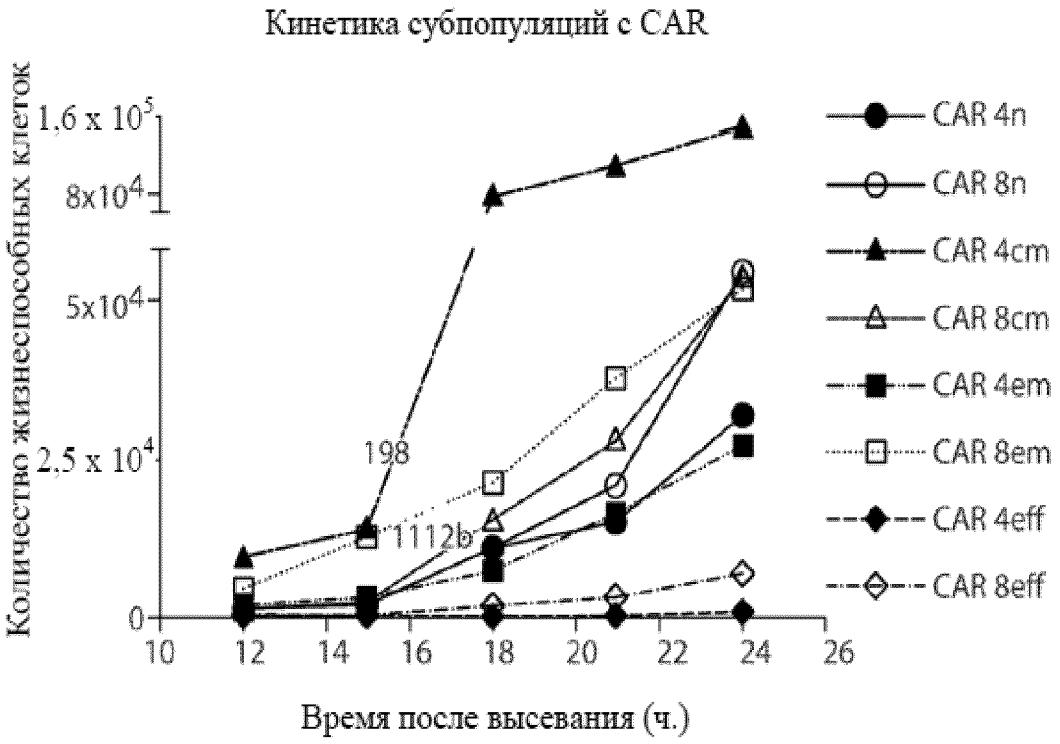
ФИГ. 24B-4


24 ч.
11,1
FSC
CAR
61,9
0,87
3,54
33,7
56,2
0
0
43,8
CD4
CD8
42,9
35,5
6,95
14,7
23,5
53,8
2,27
20,4
CCR7
CD45RO

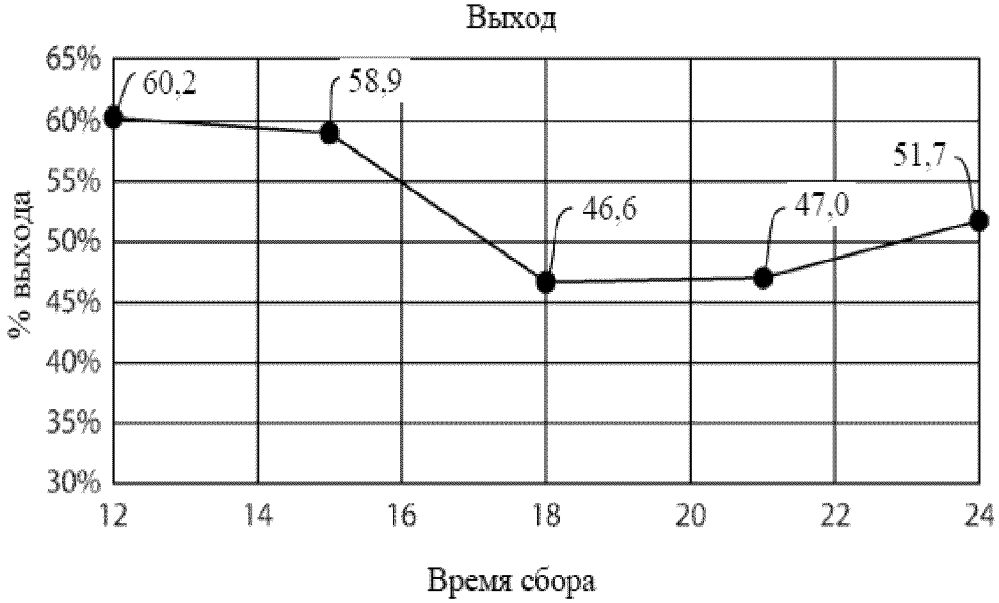
ФИГ. 24В-5


24 ч. UTD
0,060
FSC
CAR
62,4
1,04
CD4
3,91
32,6
CD8
44,8
32,5
CCR7
7,76
14,9
CD45RO

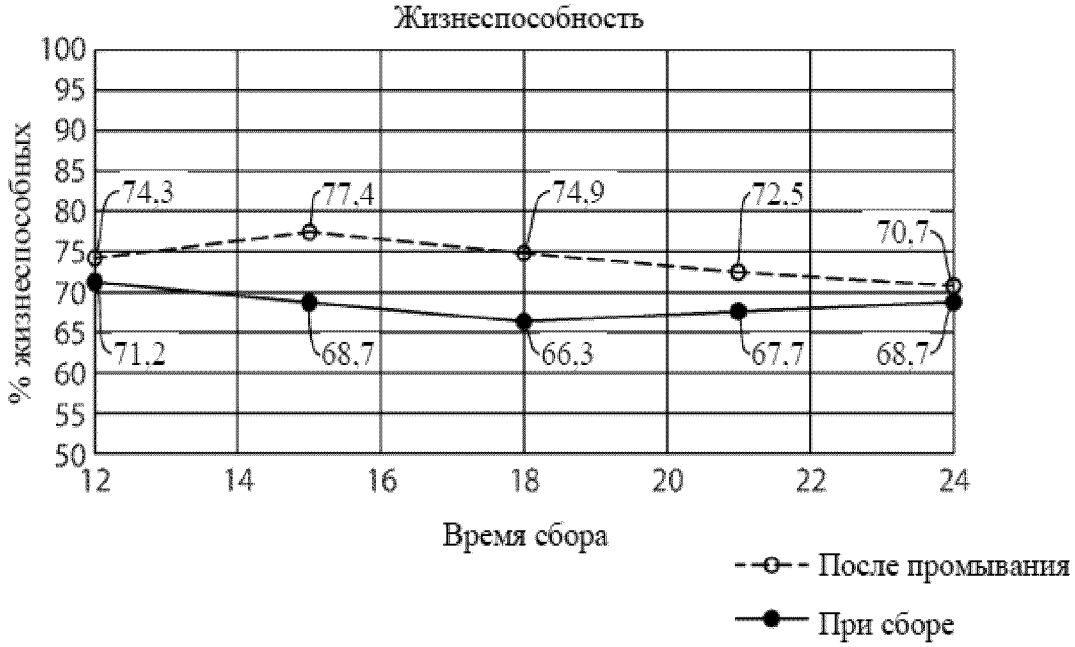
ФИГ. 24B-6


Кинетика субпопуляций с CAR
Количество жизнеспособных клеток
1,6 x 10^5
8x10^4
5x10^4
2,5 x 10^4
0
198
1112b
10
12
14
16
18
20
22
24
26
Время после высевания (ч.)
CAR 4n
CAR 8n
CAR 4cm
CAR 8cm
CAR 4em
CAR 8em
CAR 4eff
CAR 8eff

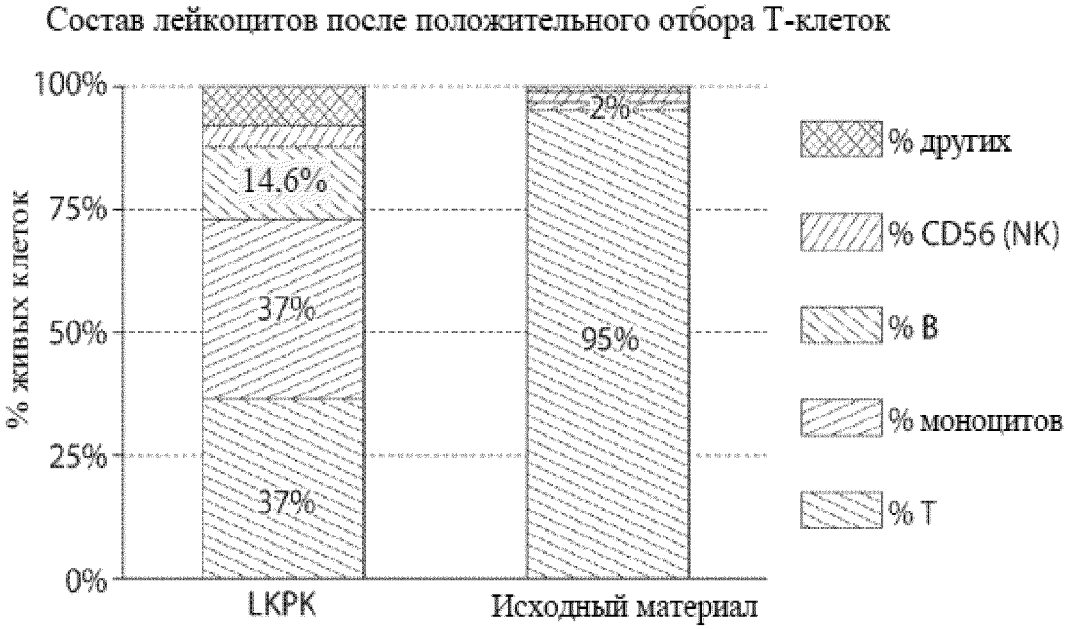
ФИГ. 25


Выход
65%
60%
55%
50%
45%
40%
35%
30%
% выхода
60,2
58,9
46,6
47,0
51,7
12
14
16
18
20
22
24
Время сбора

ФИГ. 26

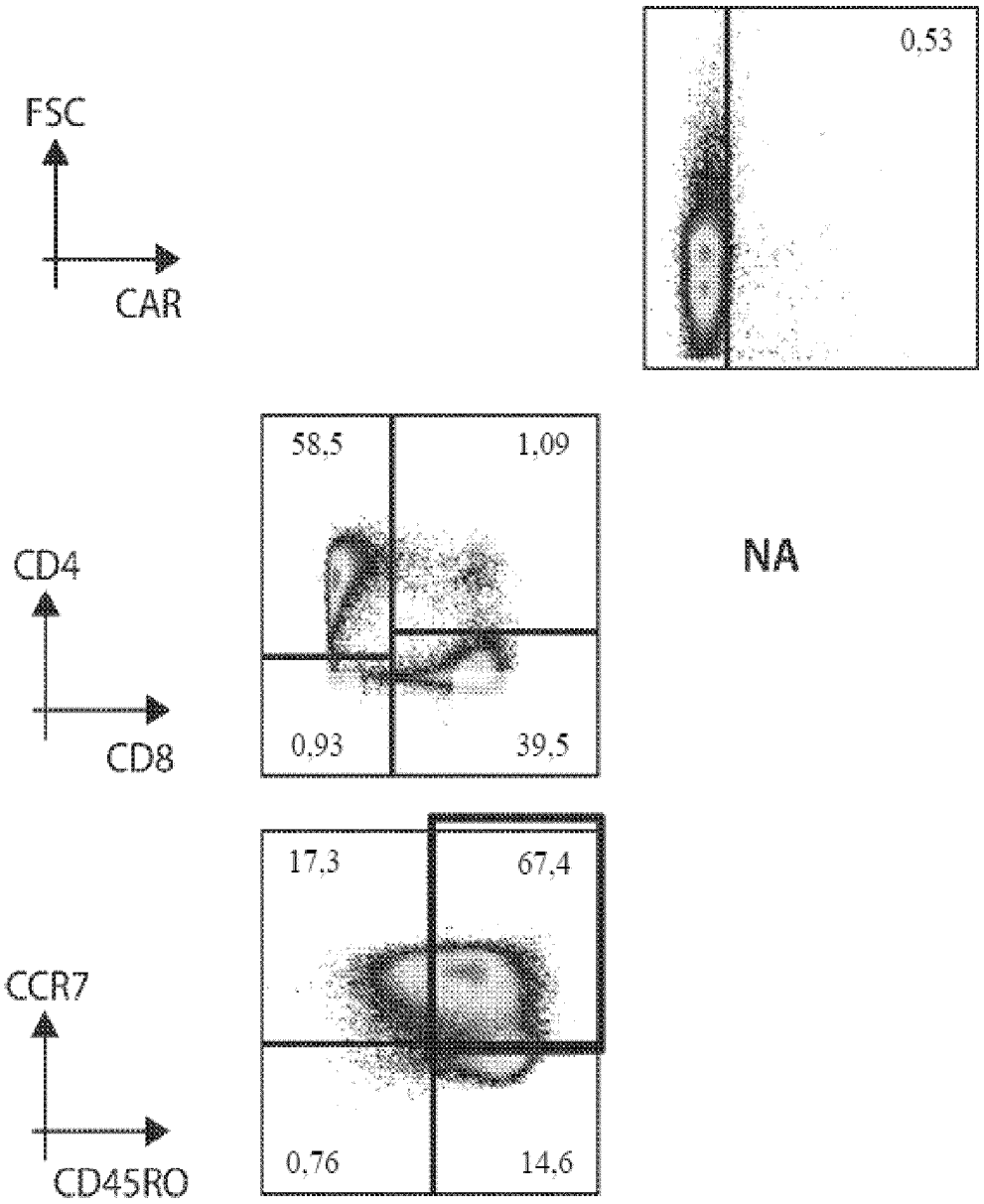

Жизнеспособность
% жизнеспособных
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
12
14
16
18
20
22
24
74.3
77.4
74.9
72.5
70.7
71.2
68.7
66.3
67.7
68.7
Время сбора
После промывания
При сборе

ФИГ. 27


Состав лейкоцитов после положительного отбора Т-клеток
% живых клеток
100%
75%
50%
25%
0%
14.6%
37%
37%
2%
95%
LKPK
Исходный материал
% других
% CD56 (NK)
% B
% моноцитов
% T

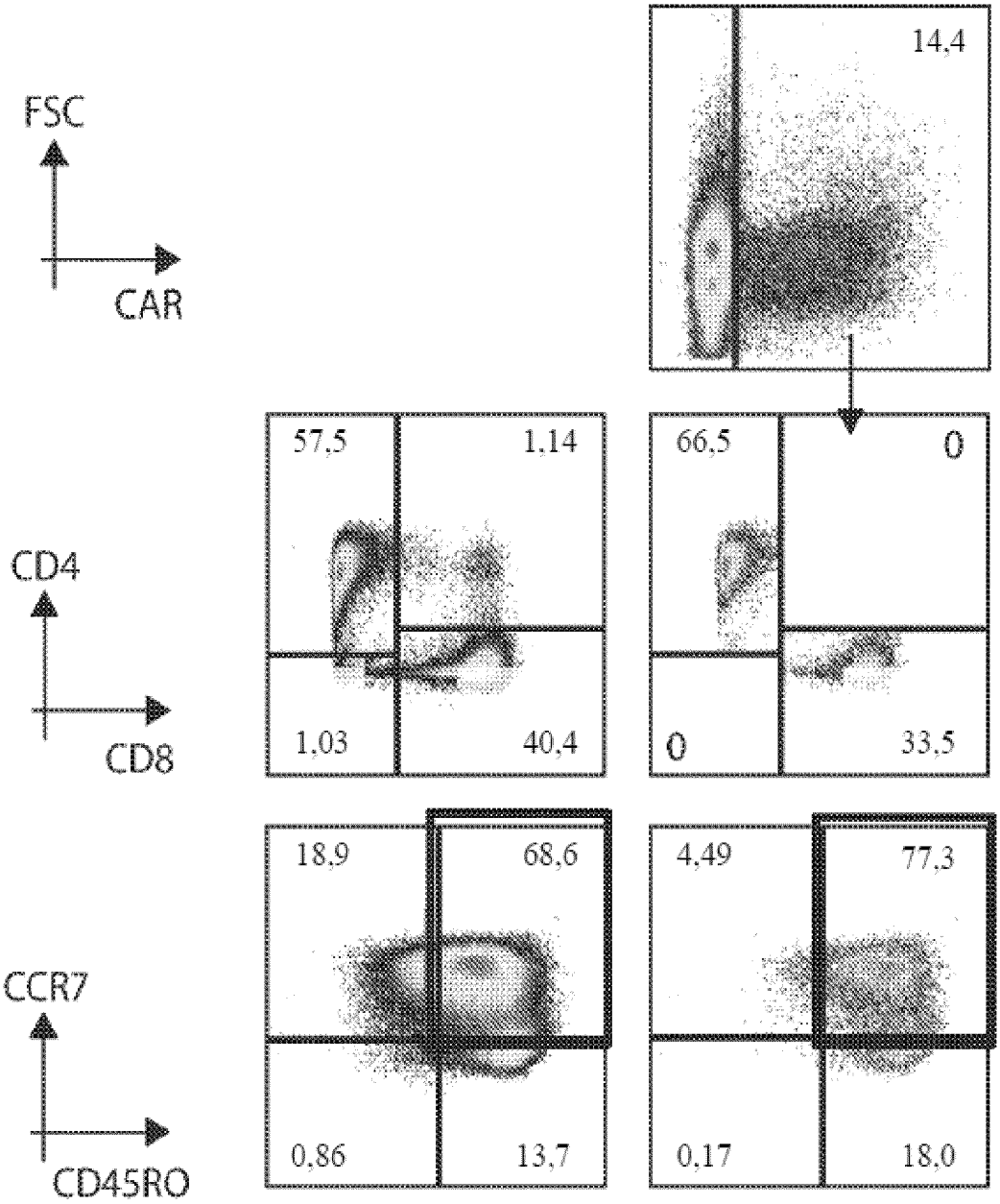
ФИГ. 28А

TM-UTD

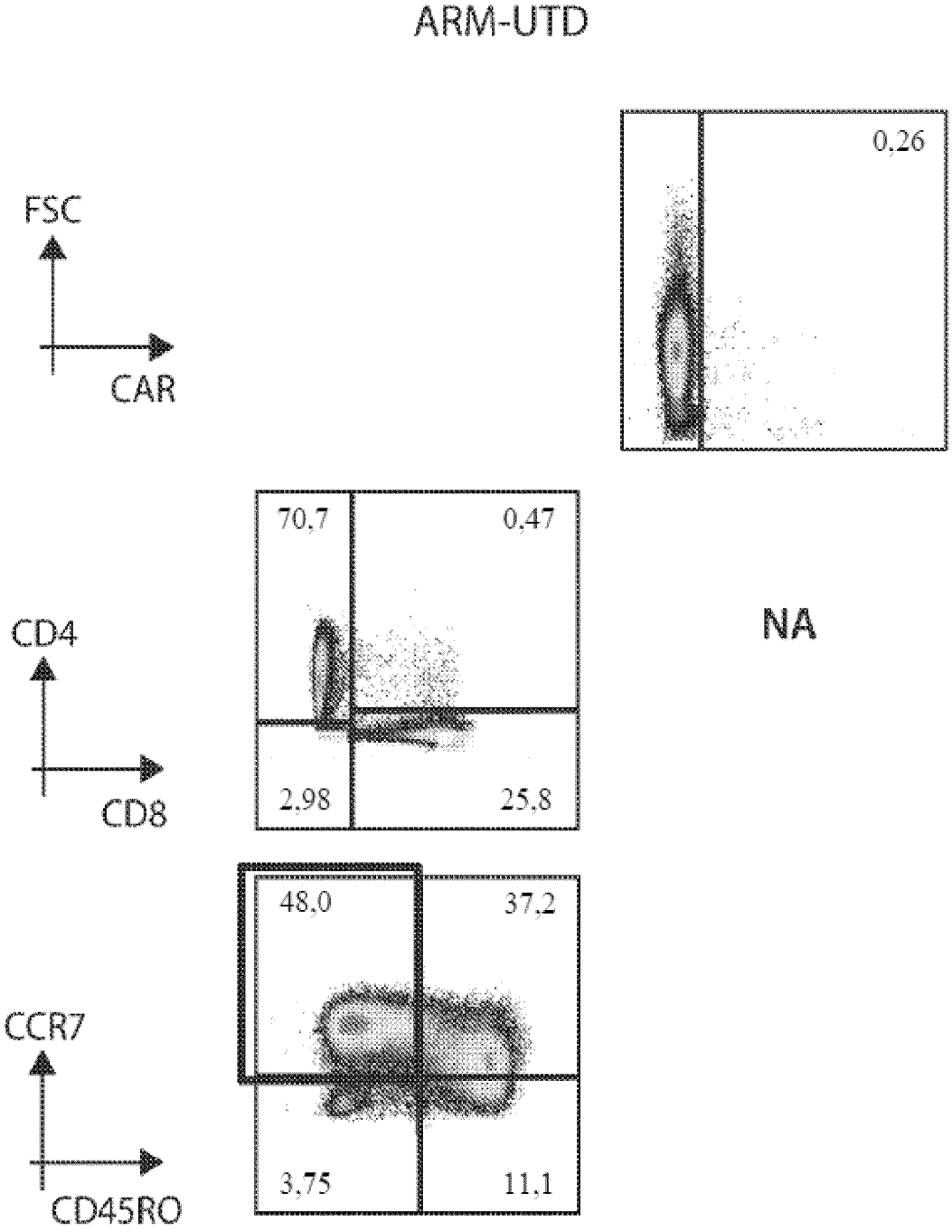


ФИГ. 28B-1

TM-CAR для CD19

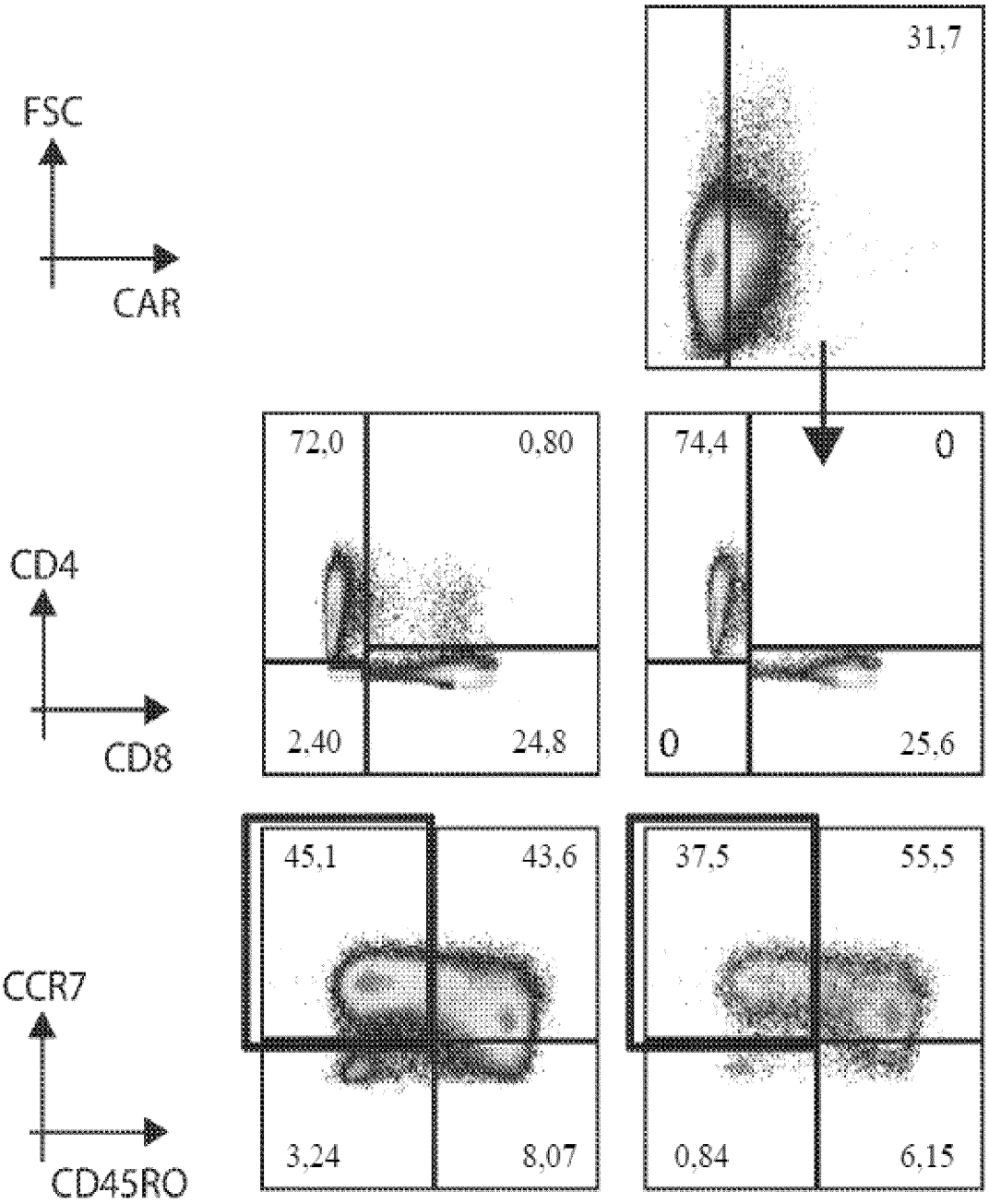


ФИГ. 28B-2

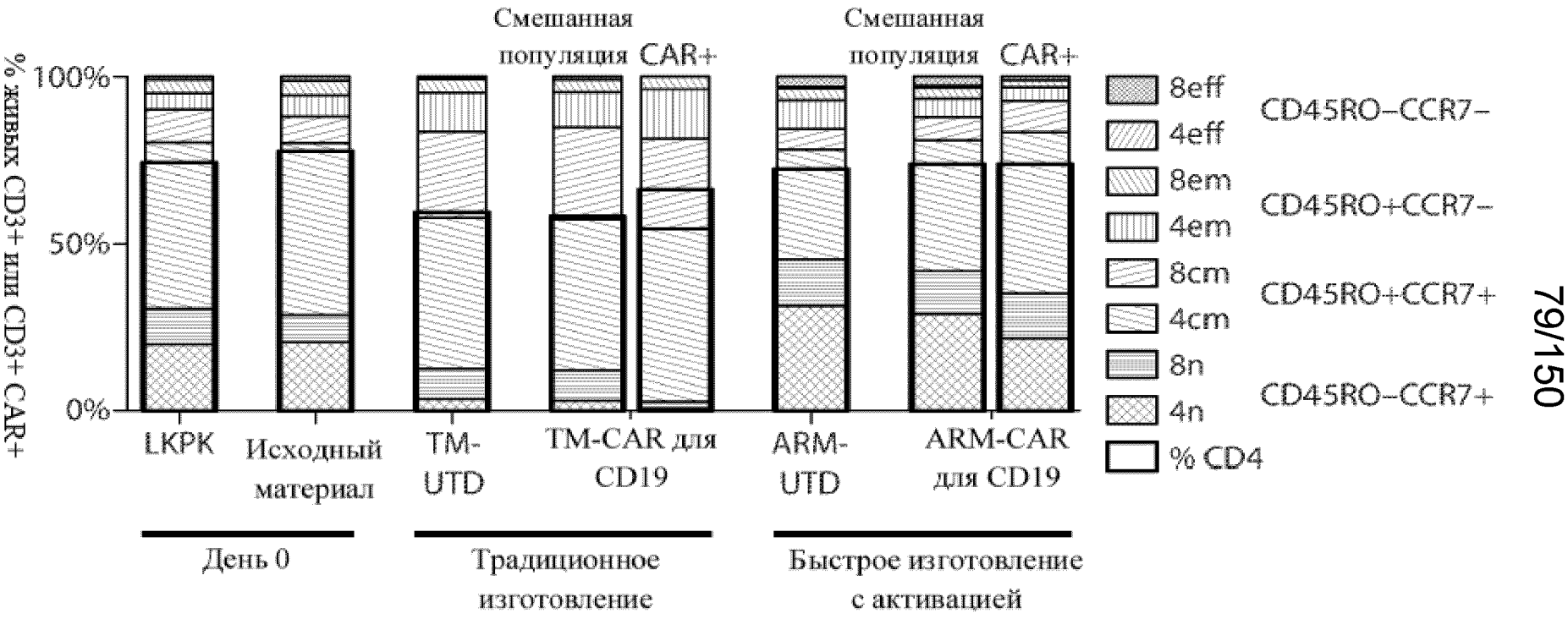

ARM-UTD
FSC
CAR
0,26
CD4
CD8
70,7
0,47
2,98
25,8
NA
CCR7
CD45RO
48,0
37,2
3,75
11,1

ФИГ. 28B-3

ARM-CAR для CD19



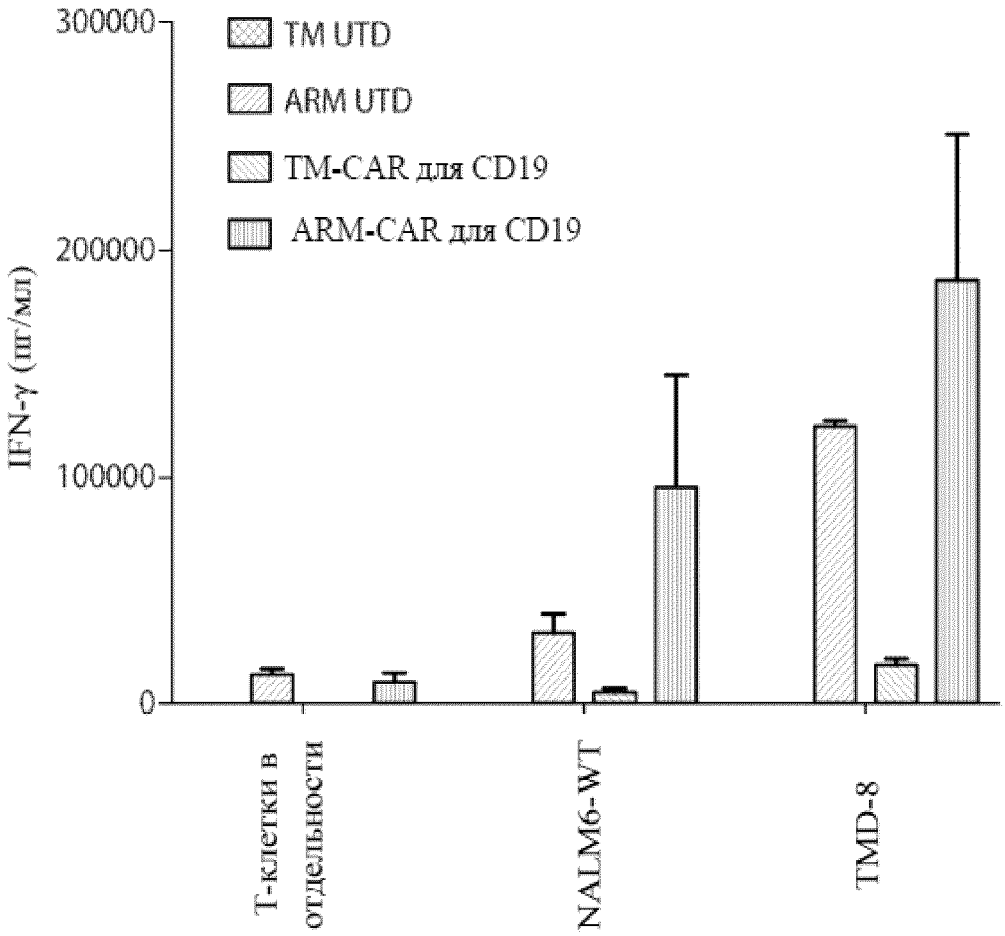
ФИГ. 28B-4


% живых CD3+ или CD3+ CAR+
100%
50%
0%
LKPK
Исходный материал
TM-UTD
TM-CAR для CD19
ARM-UTD
ARM-CAR для CD19
Смешанная популяция
CAR+
Смешанная популяция
CAR+
8eff
4eff
8em
4em
8cm
4cm
8n
4n
% CD4
CD45RO−CCR7−
CD45RO+CCR7−
CD45RO+CCR7+
CD45RO−CCR7+
День 0
Традиционное изготовление
Быстрое изготовление с активацией

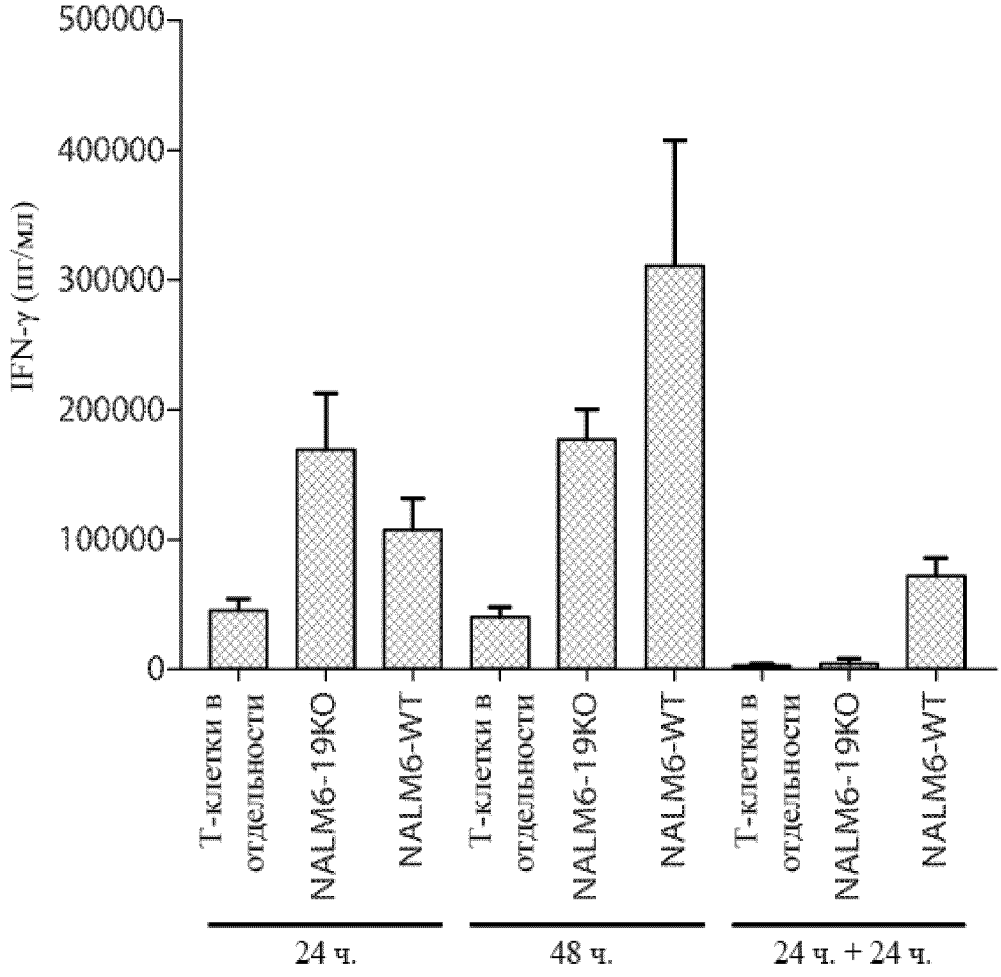
ФИГ. 28C

	LKPK	Исходный материал	TM-UTD	TM-CAR для CD19		ARM-UTD	ARM-CAR для CD19	
				Смешанная	CAR+		Смешанная	CAR+
Teff	0,8	1,4	0,8	0,9	0,2	3,8	3,2	0,8
Tem	8,7	10,7	17,3	13,7	18,0	11,1	8,1	6,2
Tcm	59,5	59,4	67,4	68,6	77,3	37,2	43,6	55,5
Tn	30,9	28,6	14,6	16,9	4,5	48,0	45,1	37,5

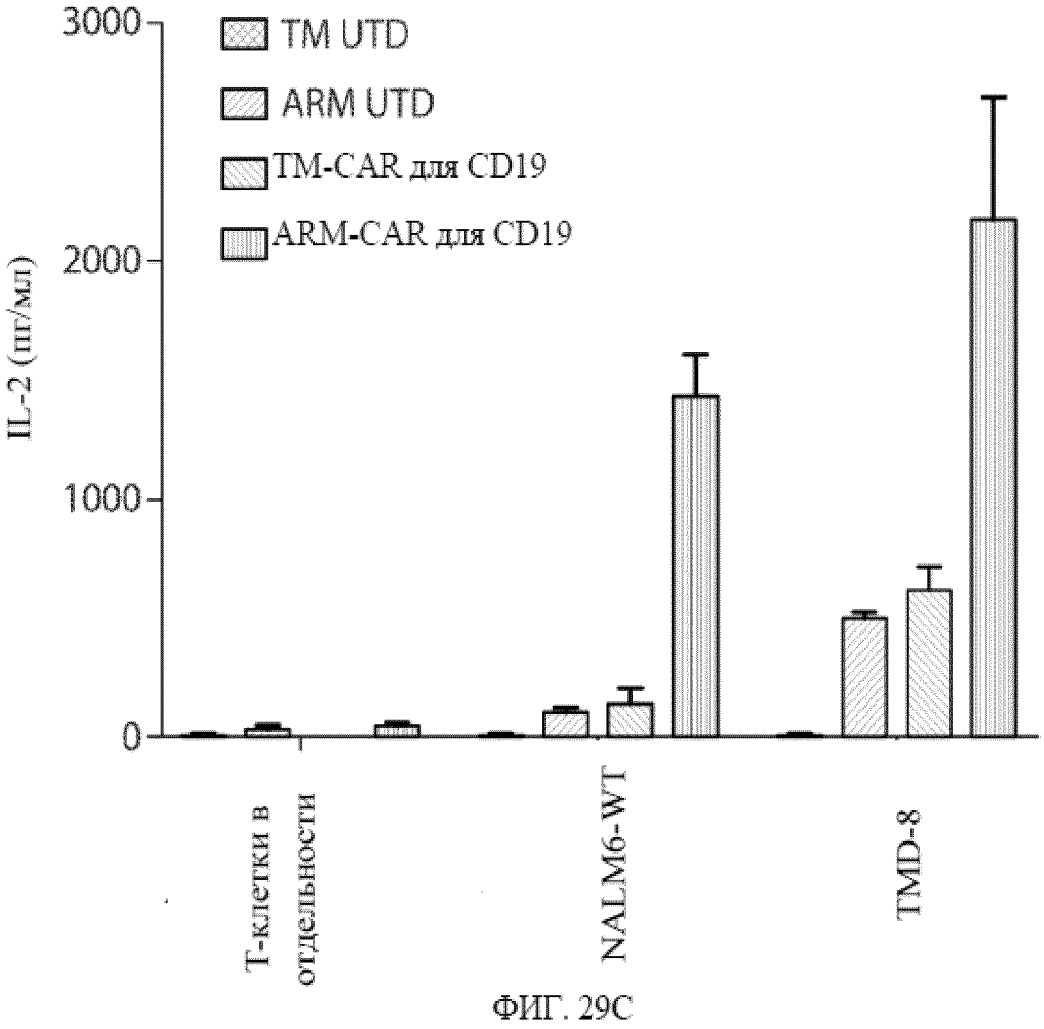
ФИГ. 28D


300000
200000
100000
0
IFN-γ (пг/мл)
TM UTD
ARM UTD
TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
Т-клетки в отдельности
NALM6-WT
TMD-8

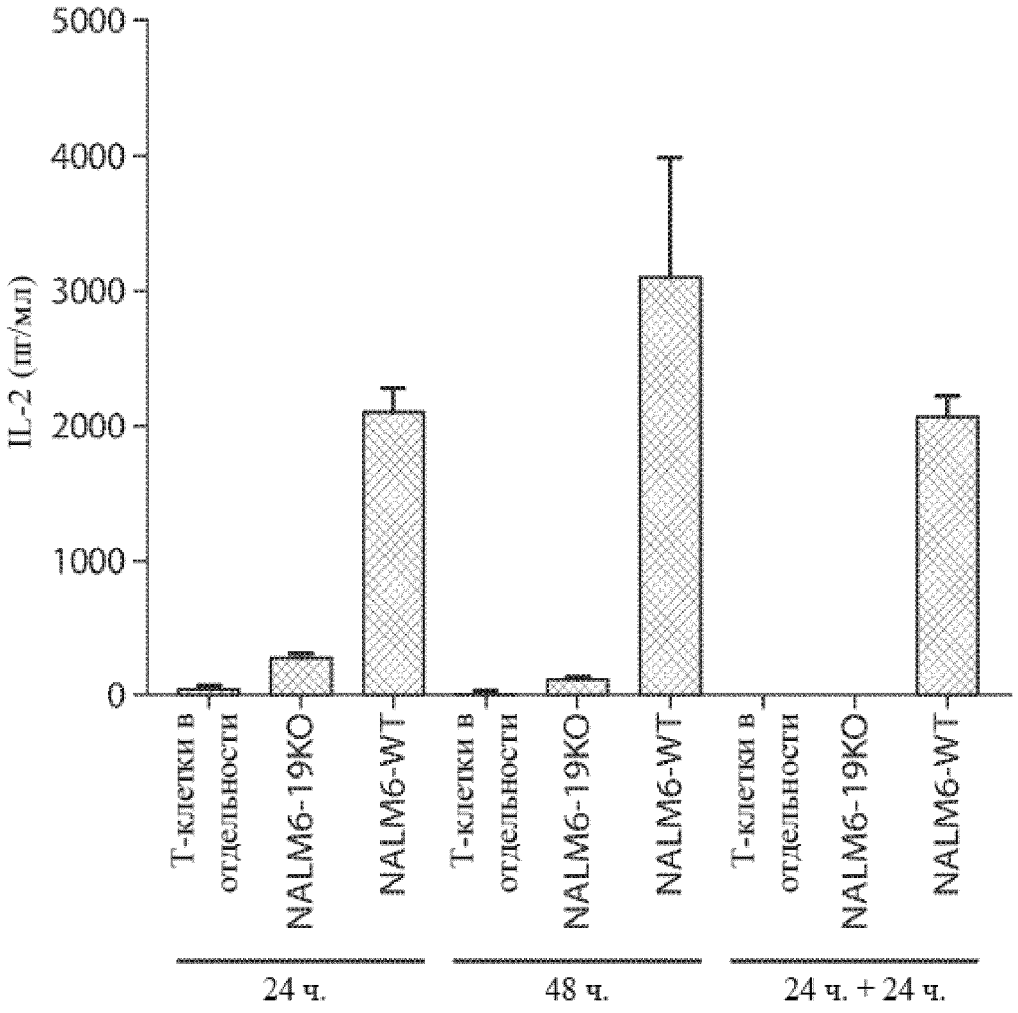
ФИГ. 29A


500000
400000
300000
200000
100000
0
IFN-γ (пг/мл)
Т-клетки в отдельности
NALM6-19KO
NALM6-WT
Т-клетки в отдельности
NALM6-19KO
NALM6-WT
Т-клетки в отдельности
NALM6-19KO
NALM6-WT
24 ч.
48 ч.
24 ч. + 24 ч.

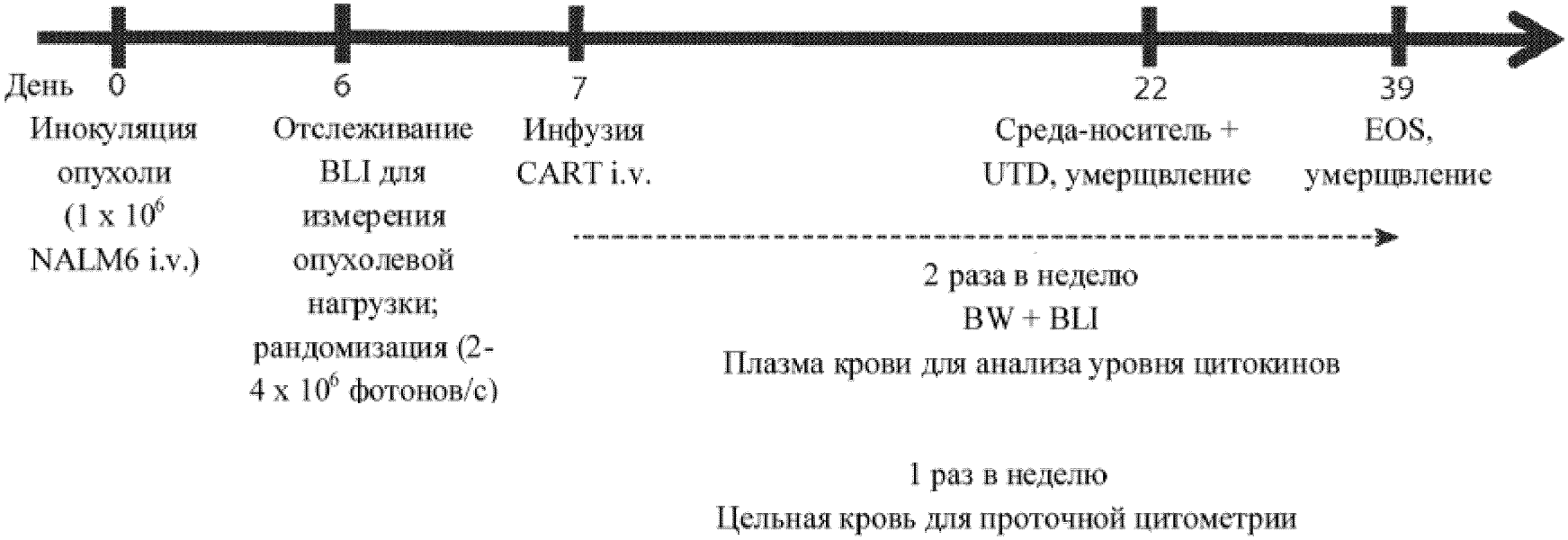
ФИГ. 29В


3000
2000
1000
0
IL-2 (пг/мл)
TM UTD
ARM UTD
TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
Т-клетки в отдельности
NALM6-WT
TMD-8

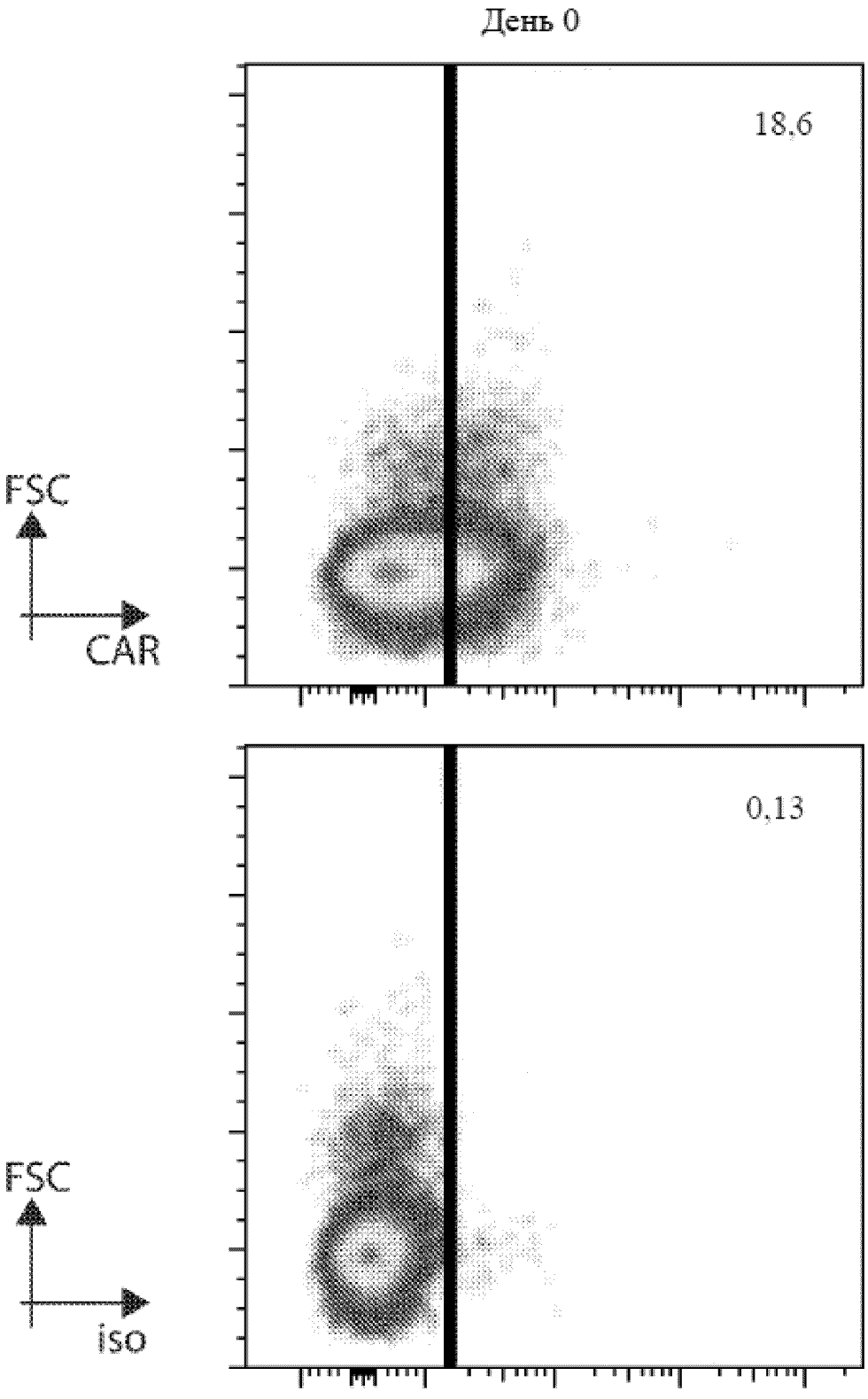
ФИГ. 29С


5000
4000
3000
2000
1000
0
IL-2 (пг/мл)
Т-клетки в отдельности
NALM6-19KO
NALM6-WT
Т-клетки в отдельности
NALM6-19KO
NALM6-WT
Т-клетки в отдельности
NALM6-19KO
NALM6-WT
24 ч.
48 ч.
24 ч. + 24 ч.

ФИГ. 29D

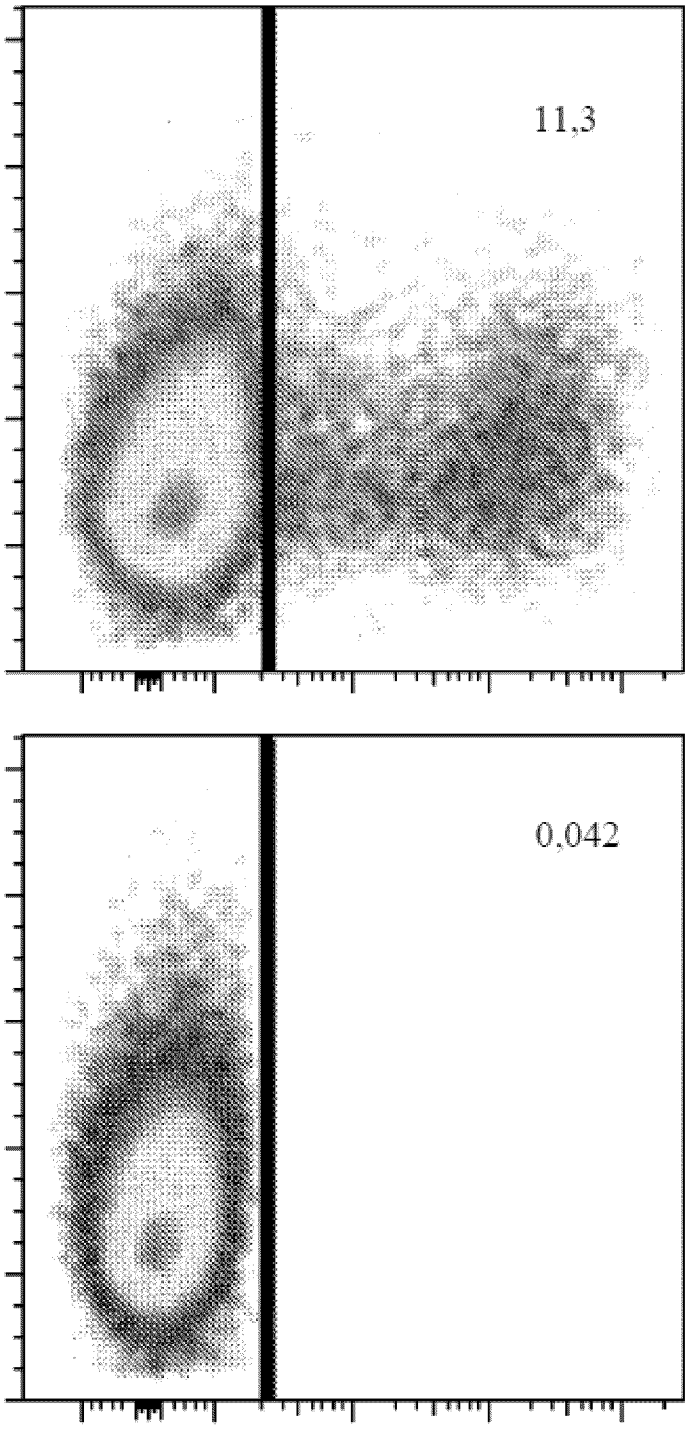

День 0
Инокуляция опухоли (1 x 10^6 NALM6 i.v.)
6
Отслеживание BLI для измерения опухолевой нагрузки; рандомизация (2-4 x 10^6 фотонов/с)
7
Инфузия CART i.v.
22
Среда-носитель + UTD, умерщвление
39
EOS, умерщвление
2 раза в неделю
BW + BLI
Плазма крови для анализа уровня цитокинов
1 раз в неделю
Цельная кровь для проточной цитометрии

ФИГ. 30А



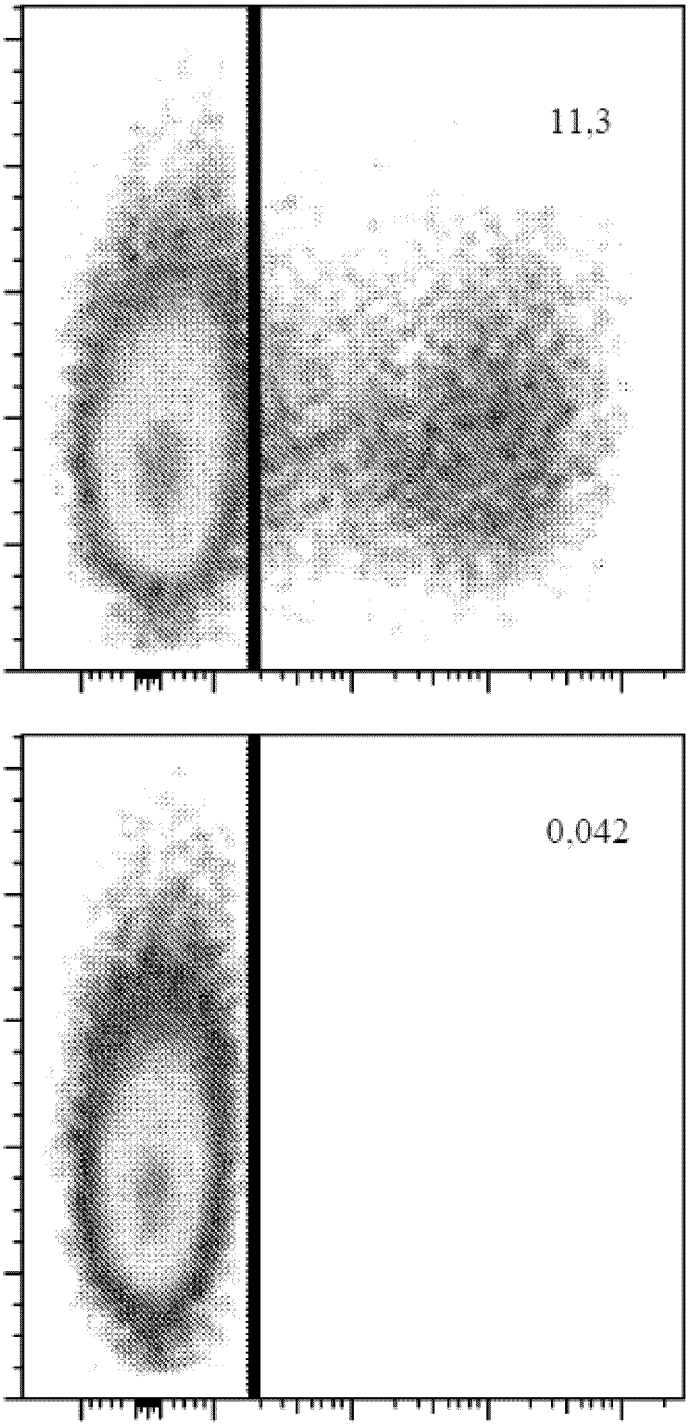
ФИГ. 30B-1

День 2



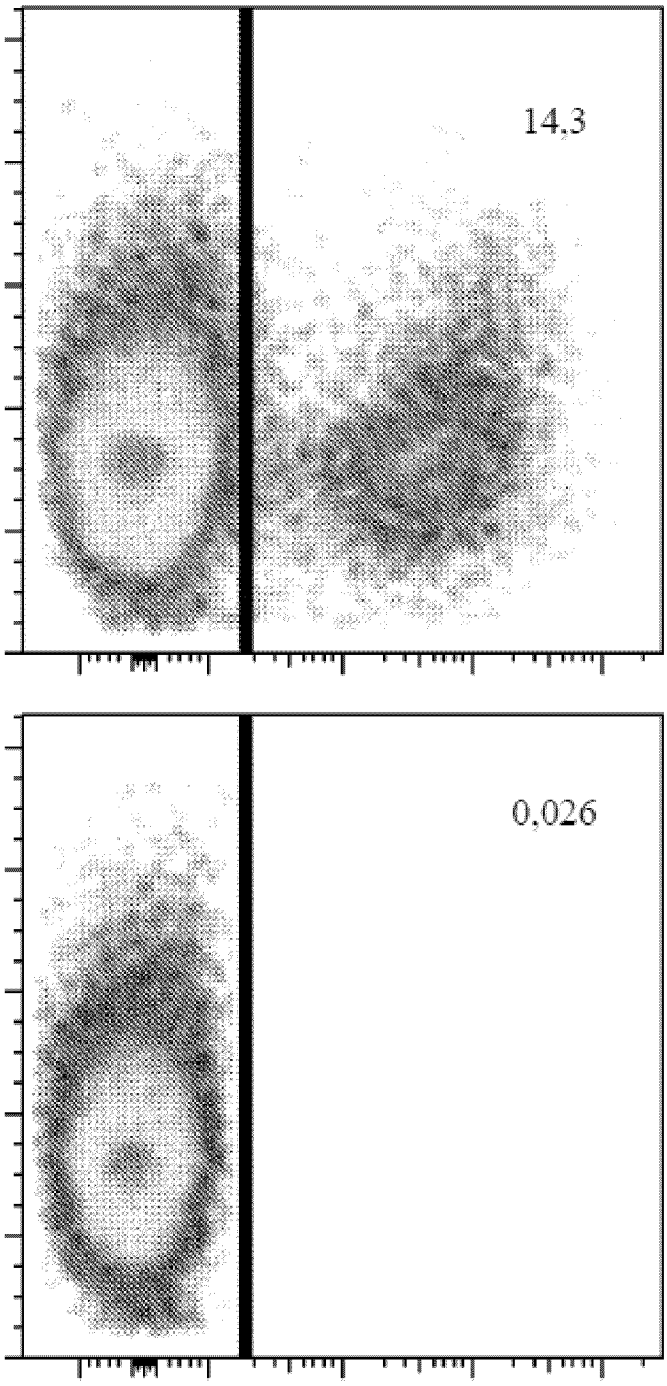
ФИГ. 30B-2

День 3

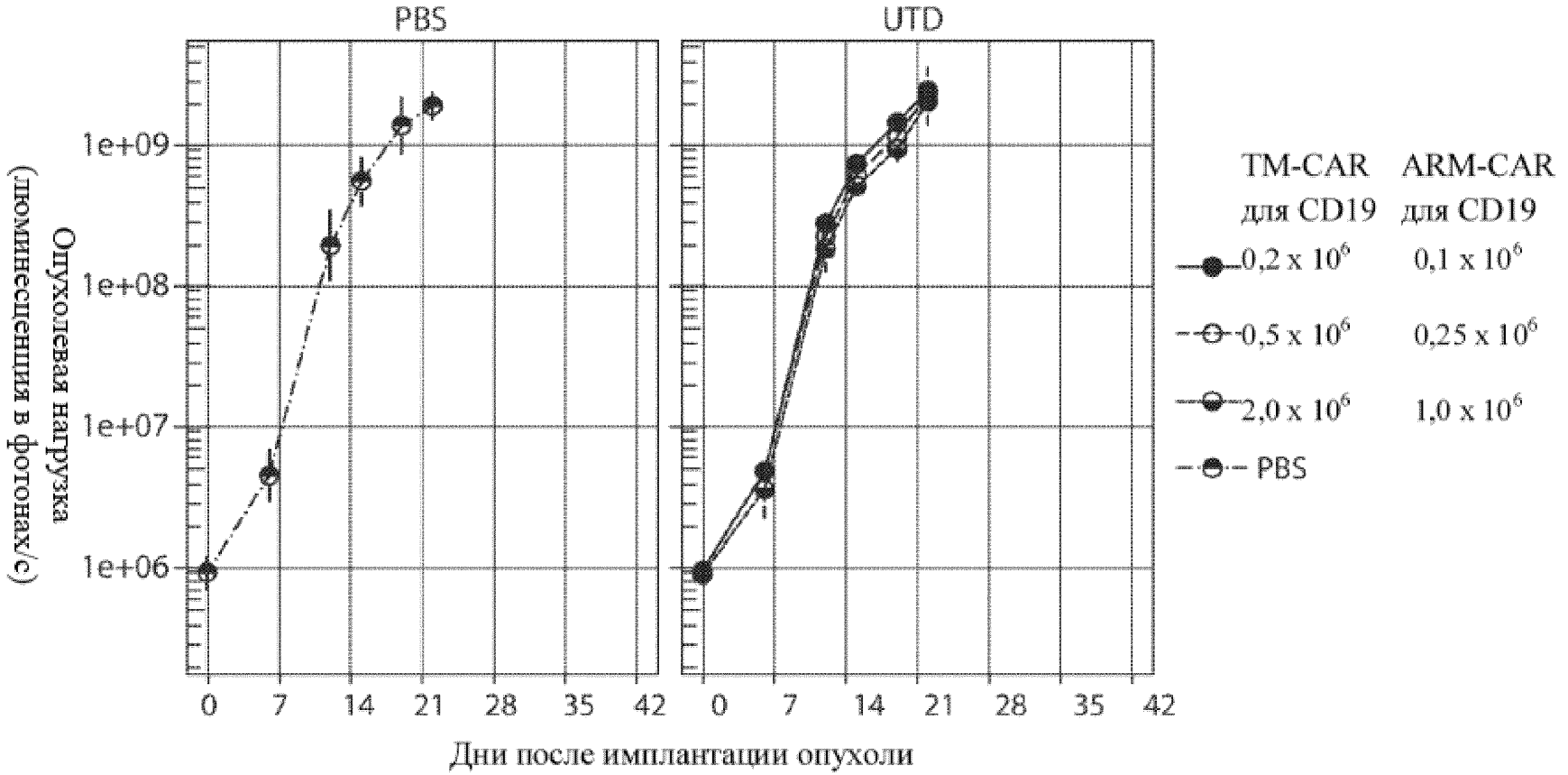


ФИГ. 30B-3

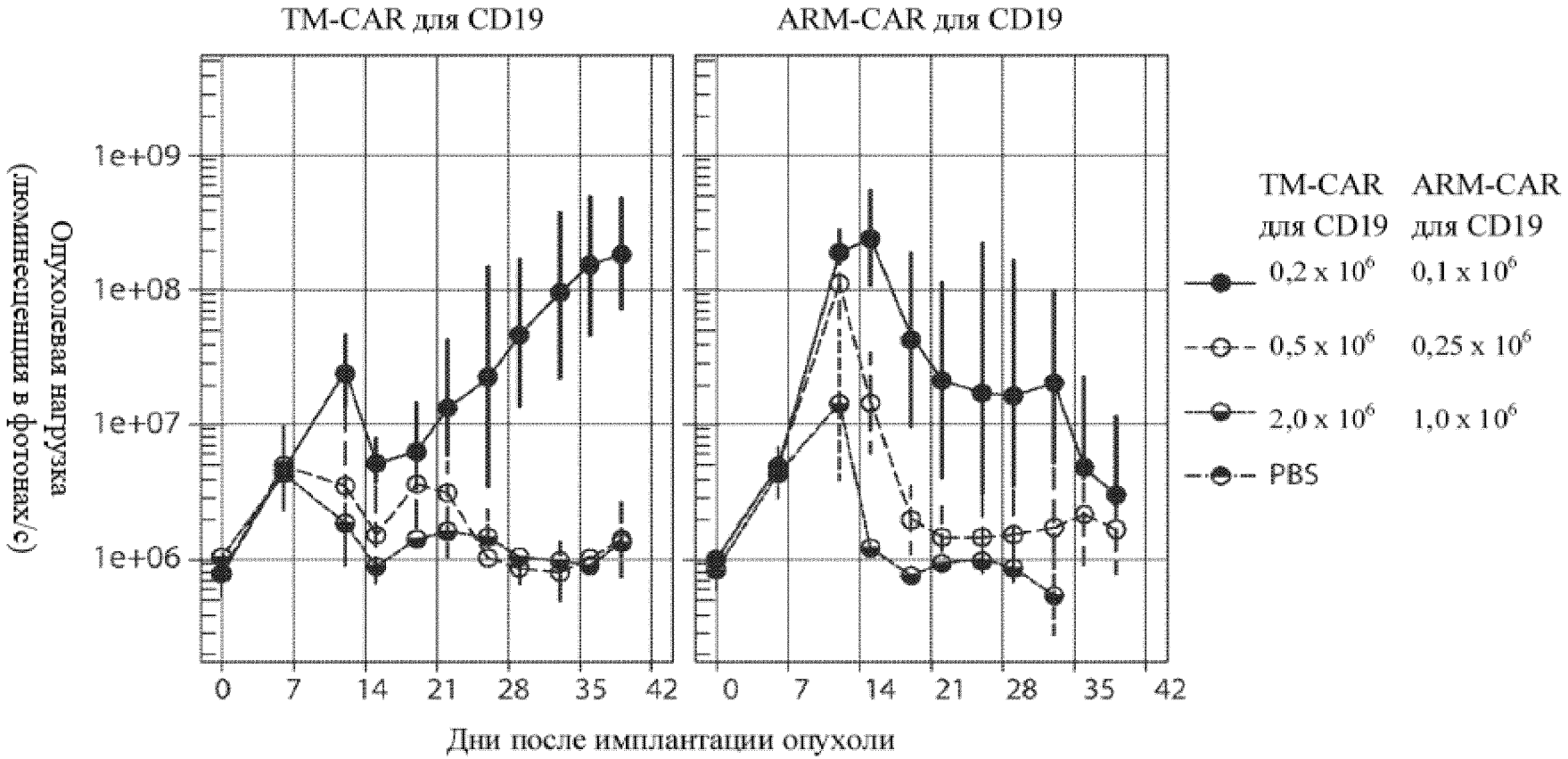
День 5



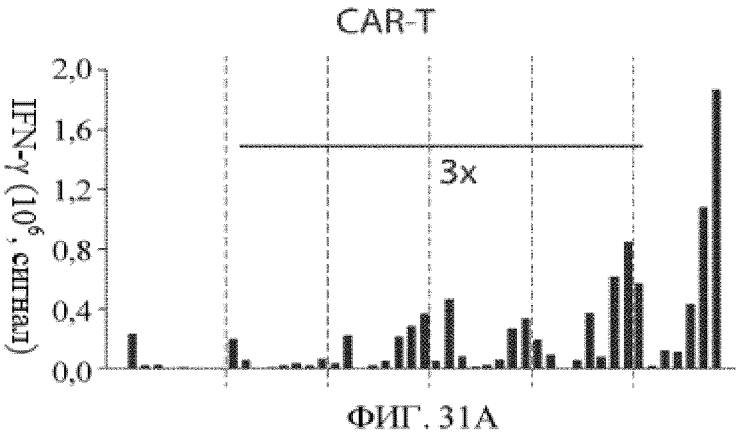
ФИГ. 30B-4


PBS
UTD
1e+09
1e+08
1e+07
1e+06
Опухолевая нагрузка (люминесценция в фотонах/с)
0
7
14
21
28
35
42
Дни после имплантации опухоли
TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
0,2 x 10^6
0,1 x 10^6
0,5 x 10^6
0,25 x 10^6
2,0 x 10^6
1,0 x 10^6
PBS

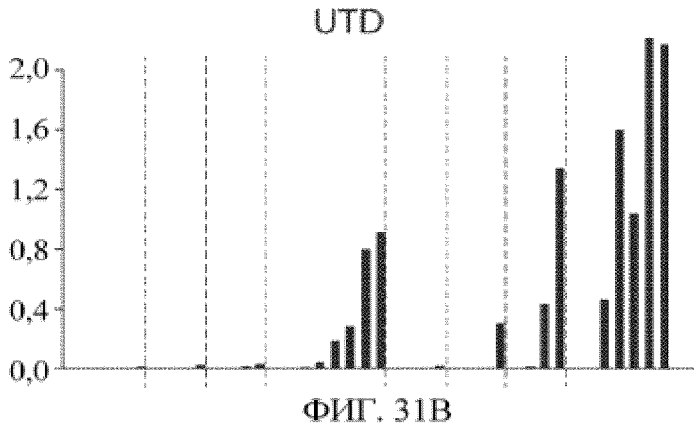
ФИГ. 30C-1


TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
Опухолевая нагрузка (люминесценция в фотонах/с)
1e+09
1e+08
1e+07
1e+06
0
7
14
21
28
35
42
Дни после имплантации опухоли
TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
0,2 x 10^6
0,1 x 10^6
0,5 x 10^6
0,25 x 10^6
2,0 x 10^6
1,0 x 10^6
PBS

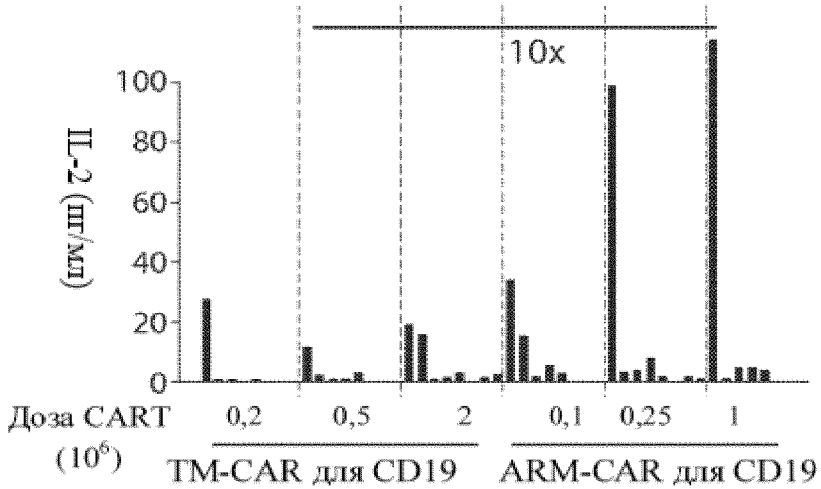
ФИГ. 30С-2



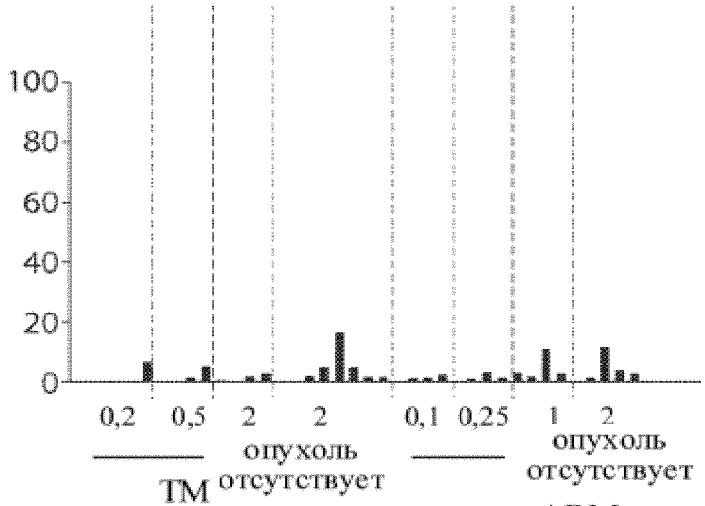
ФИГ. 31A



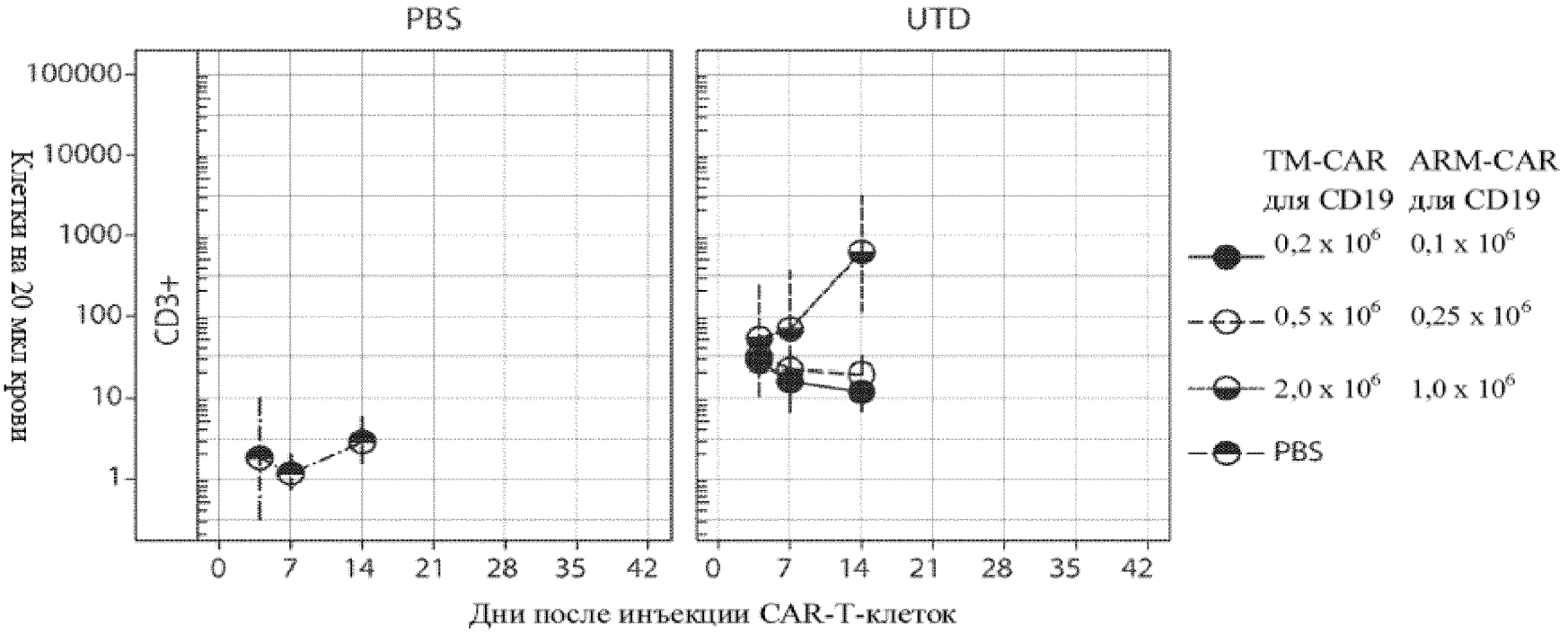
ФИГ. 31B



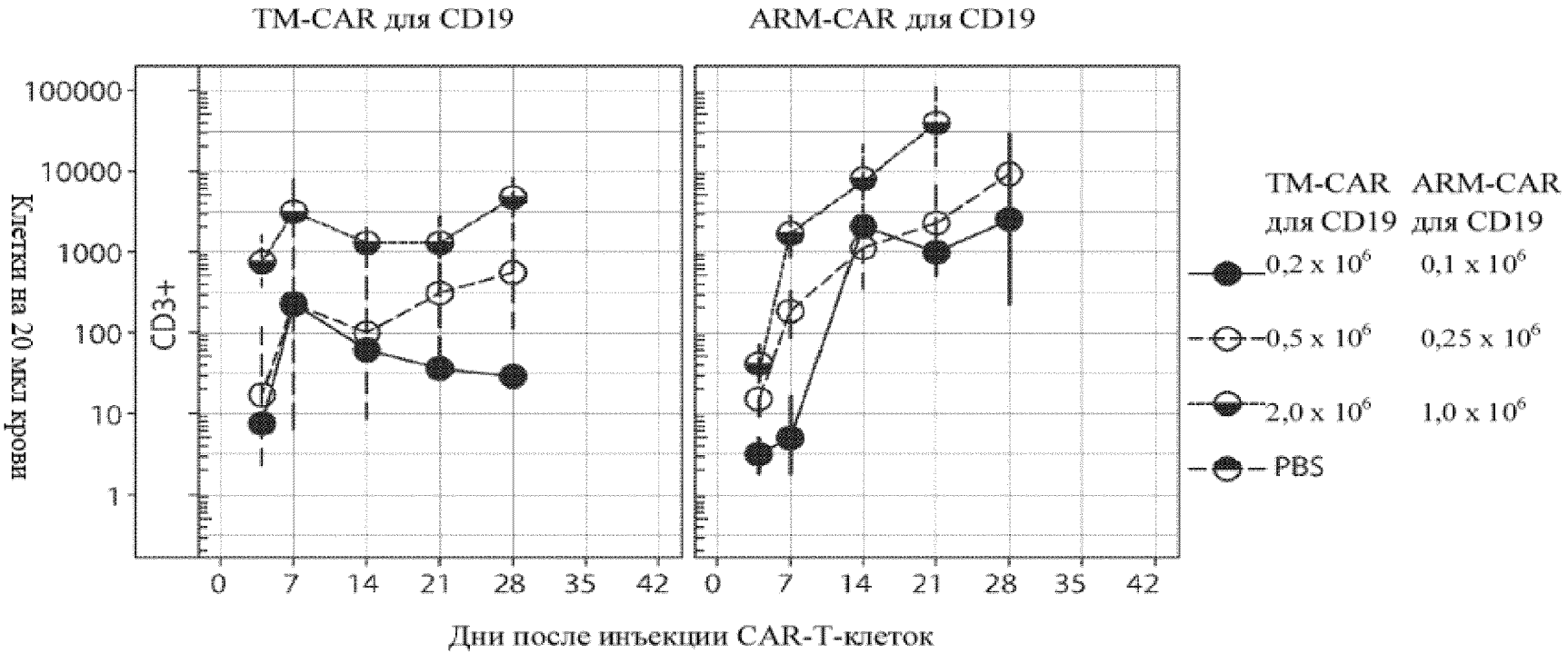
ФИГ. 31C



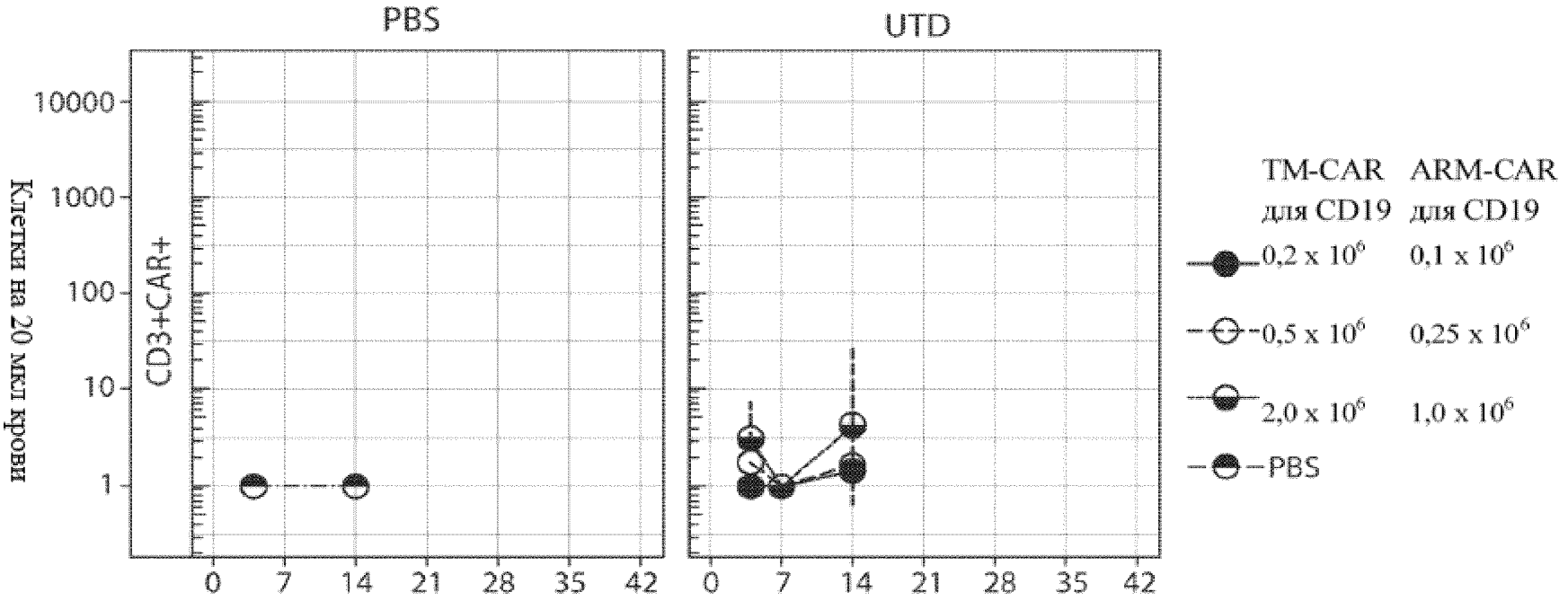
ФИГ. 31D


PBS
UTD
CD3+
Клетки на 20 мкл крови
100000
10000
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
Дни после инъекции CAR-T-клеток
TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
0,2 x 10^6
0,1 x 10^6
0,5 x 10^6
0,25 x 10^6
2,0 x 10^6
1,0 x 10^6
PBS

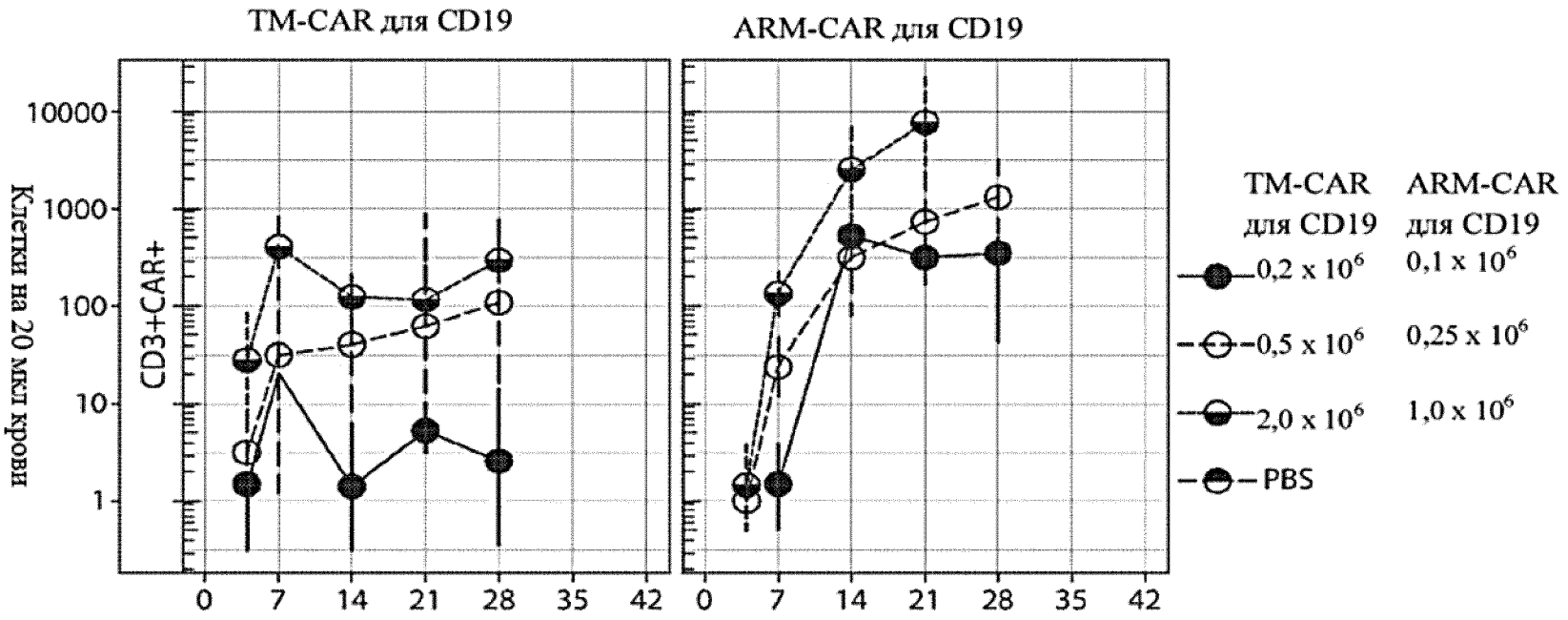
ФИГ. 32-1


TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
Клетки на 20 мкл крови
CD3+
100000
10000
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
Дни после инъекции CAR-T-клеток
TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
0,2 x 10^6
0,1 x 10^6
0,5 x 10^6
0,25 x 10^6
2,0 x 10^6
1,0 x 10^6
PBS

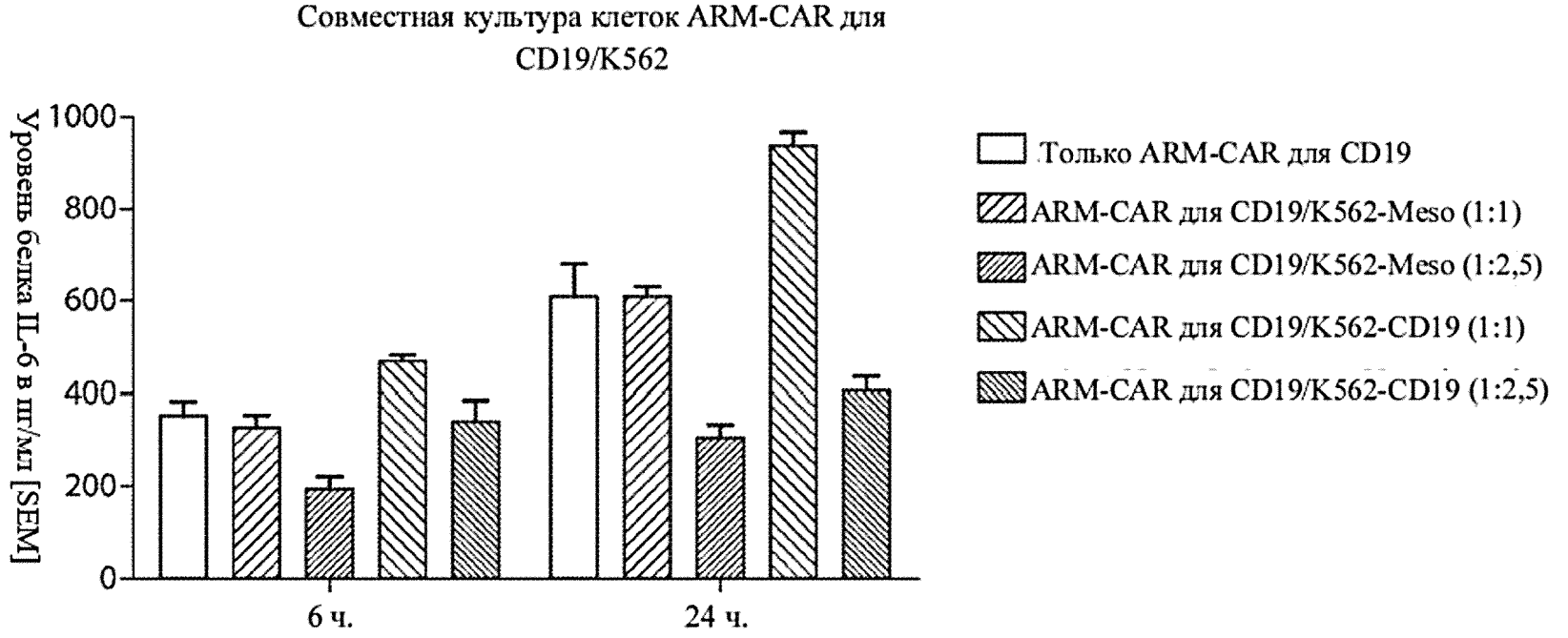
ФИГ. 32-2


PBS
UTD
CD3+CAR+
Клетки на 20 мкл крови
10000
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
Дни после инъекции CAR-T-клеток
TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
0,2 x 10^6
0,1 x 10^6
0,5 x 10^6
0,25 x 10^6
2,0 x 10^6
1,0 x 10^6
PBS

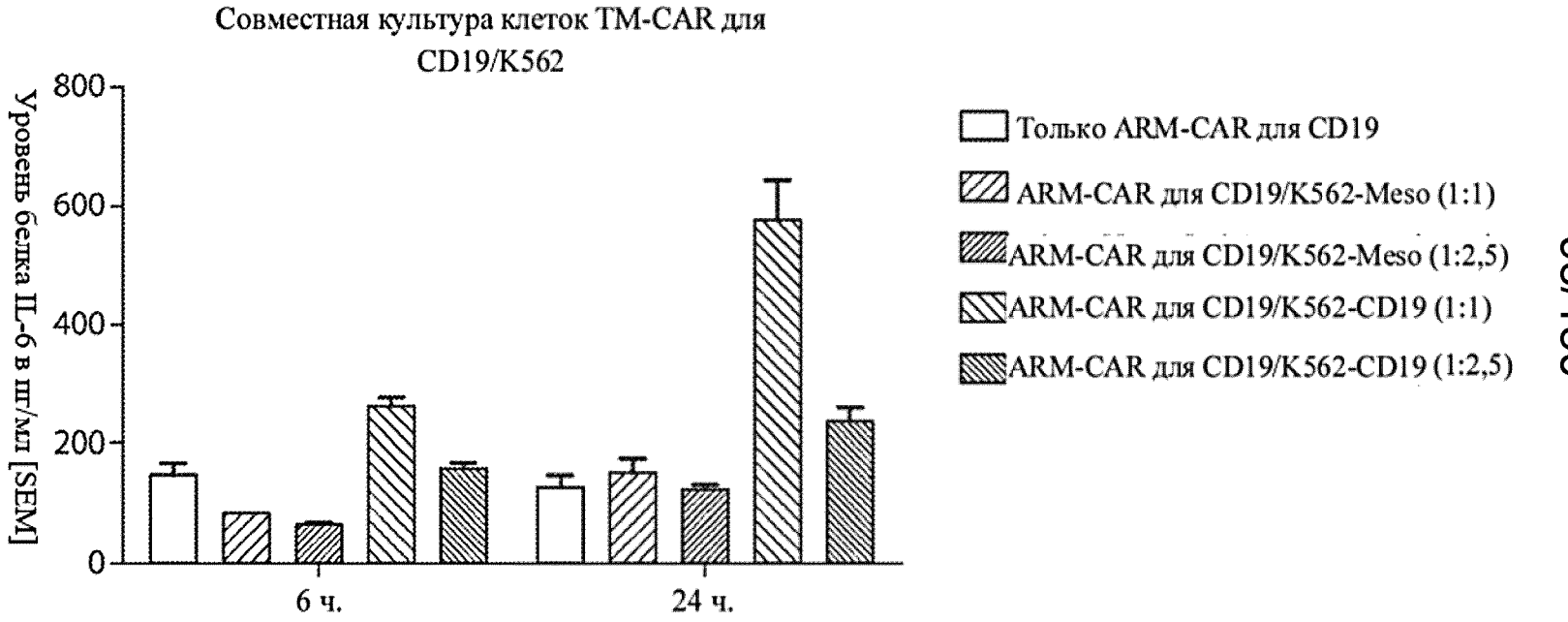
ФИГ. 32-3


TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
Клетки на 20 мкл крови
CD3+CAR+
10000
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
Дни после инъекции CAR-T-клеток
TM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19
0,2 x 10^6
0,1 x 10^6
0,5 x 10^6
0,25 x 10^6
2,0 x 10^6
1,0 x 10^6
PBS

ФИГ. 32-4


Совместная культура клеток ARM-CAR для CD19/K562
Уровень белка IL-6 в пг/мл [SEM]
1000
800
600
400
200
0
6 ч.
24 ч.
Только ARM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19/K562-Meso (1:1)
ARM-CAR для CD19/K562-Meso (1:2,5)
ARM-CAR для CD19/K562-CD19 (1:1)
ARM-CAR для CD19/K562-CD19 (1:2,5)

ФИГ. 33А

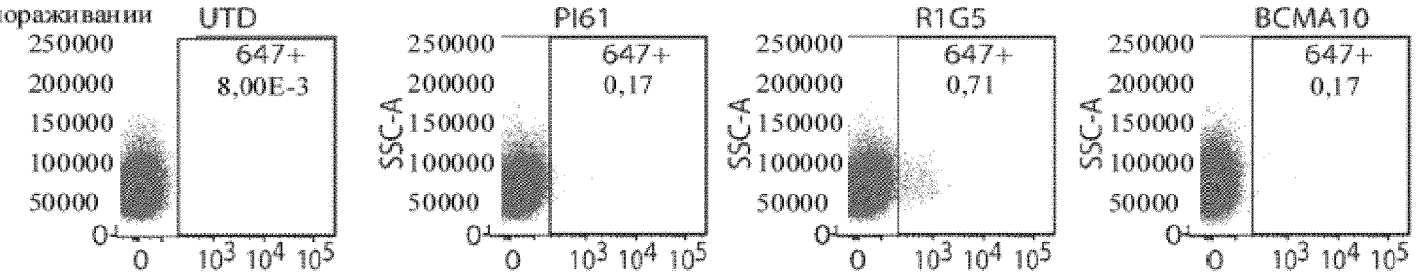

Совместная культура клеток TM-CAR для CD19/K562
Уровень белка IL-6 в пг/мл [SEM]
800
600
400
200
0
6 ч.
24 ч.
Только ARM-CAR для CD19
ARM-CAR для CD19/K562-Meso (1:1)
ARM-CAR для CD19/K562-Meso (1:2,5)
ARM-CAR для CD19/K562-CD19 (1:1)
ARM-CAR для CD19/K562-CD19 (1:2,5)

ФИГ. 33В

Способ ARM обеспечивает сохранение стволовости у BCMA-CAR+ Т-клеток

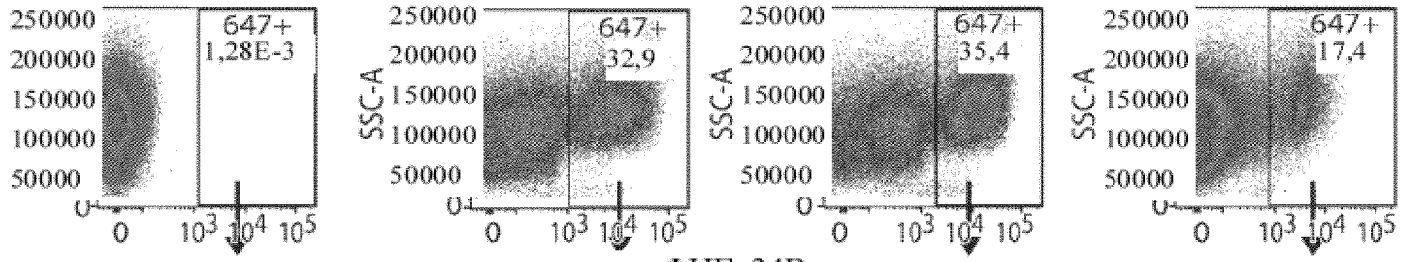
Продукт ARM

При размораживании

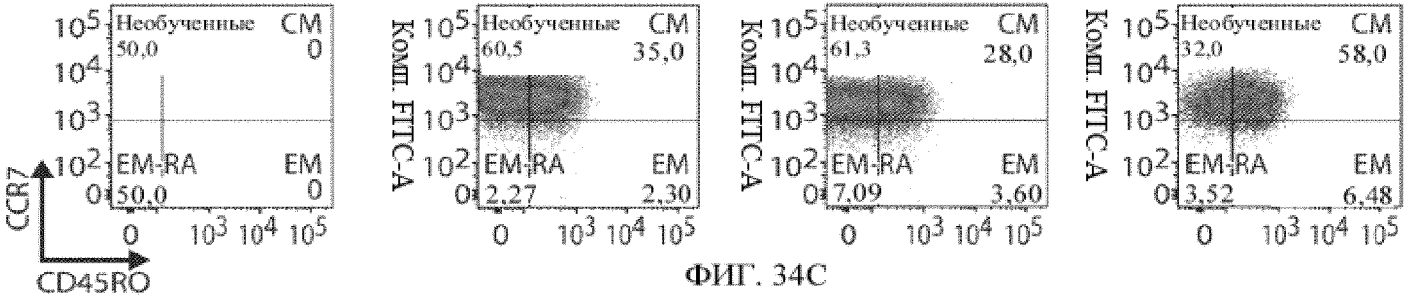


ФИГ. 34А

Через 48 ч. после размораживания

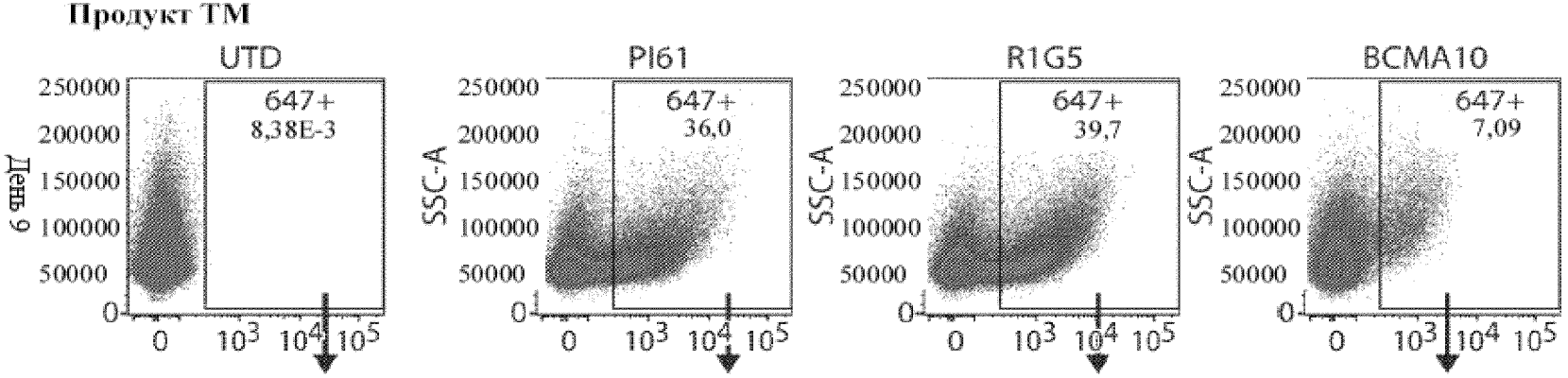


ФИГ. 34В

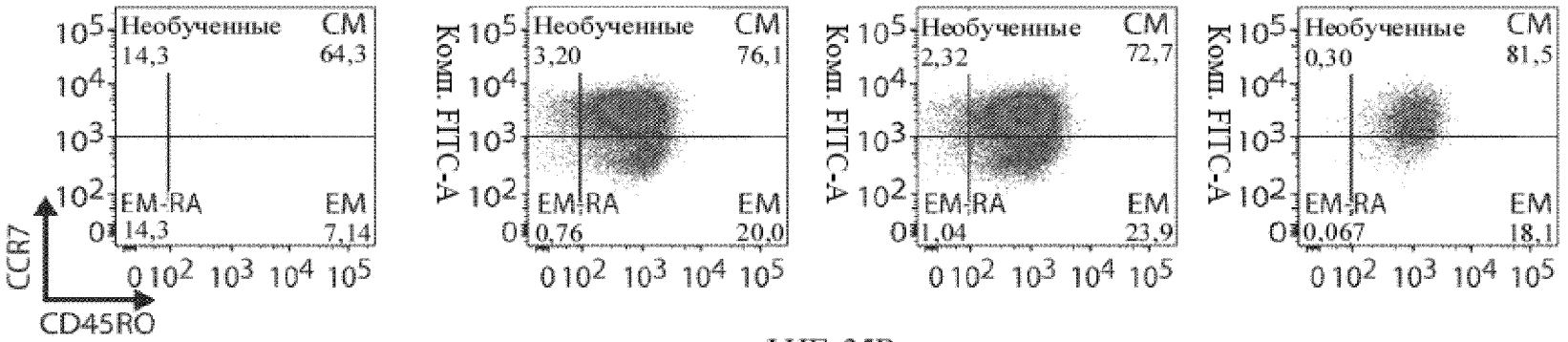


ФИГ. 34С

Способ ТМ приводил к получению главным образом центральных Т-клеток памяти (TCM) (CD45RO+/CCR7+), тогда как популяция Т-клеток, подобных необученным, практически исчезала среди CAR+ Т-клеток при применении способа ТМ



ФИГ. 35А

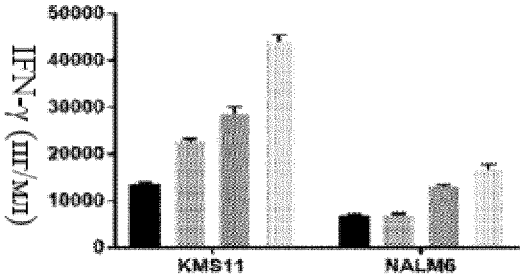


ФИГ. 35В

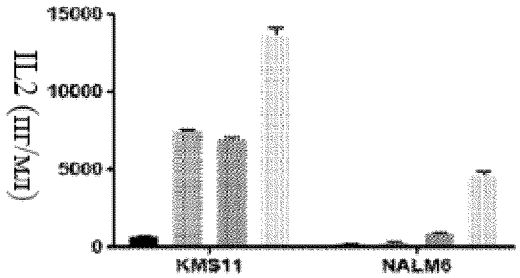
BCMA-CAR-T-клетки, полученные посредством способа ARM, демонстрируют BCMA-специфическую активацию и секретируют IL2 и IFNg на более высоких уровнях

Продукты ARM

ФИГ. 36A

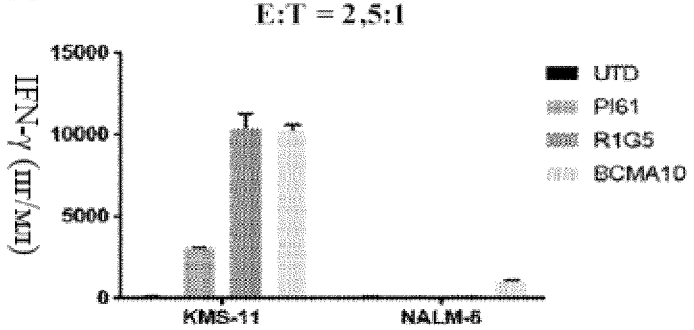


ФИГ. 36B

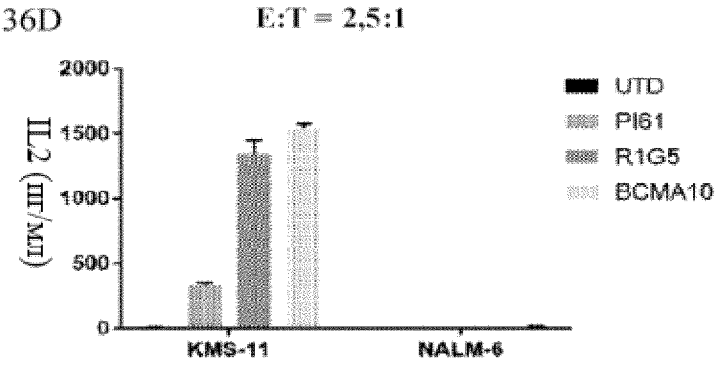


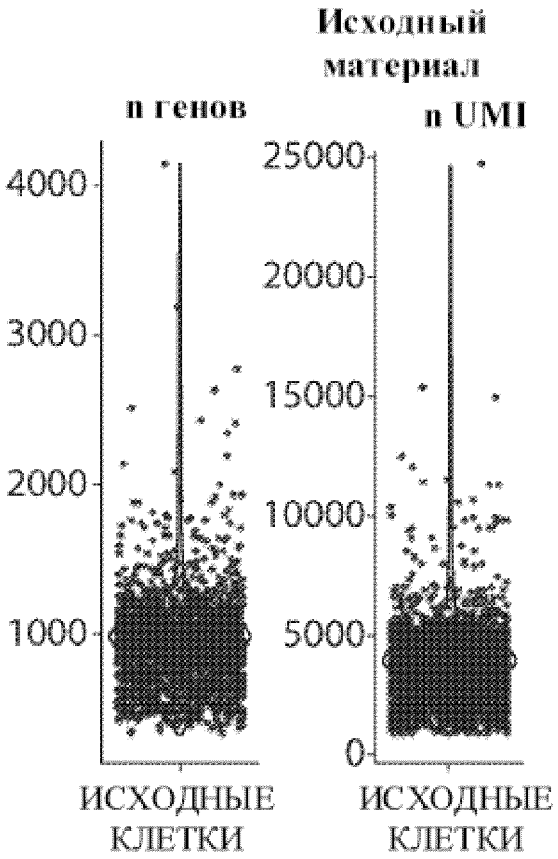
Продукты TM

ФИГ. 36C

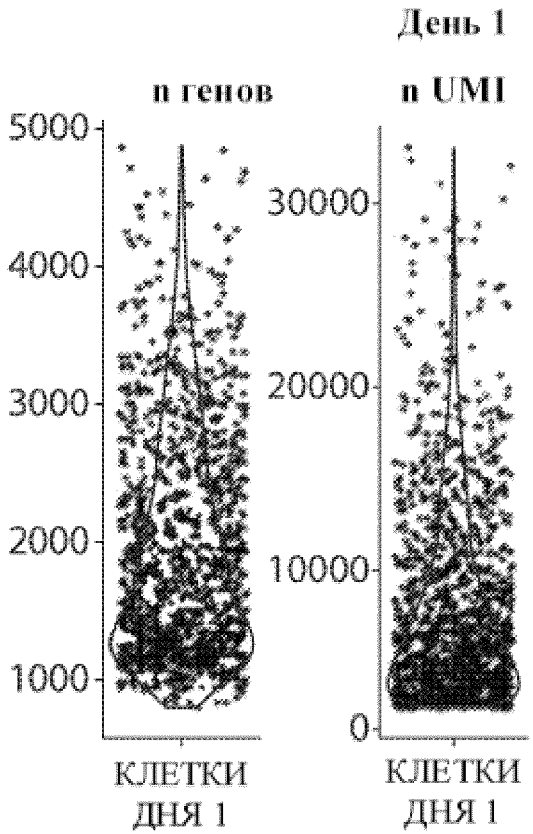


ФИГ. 36D

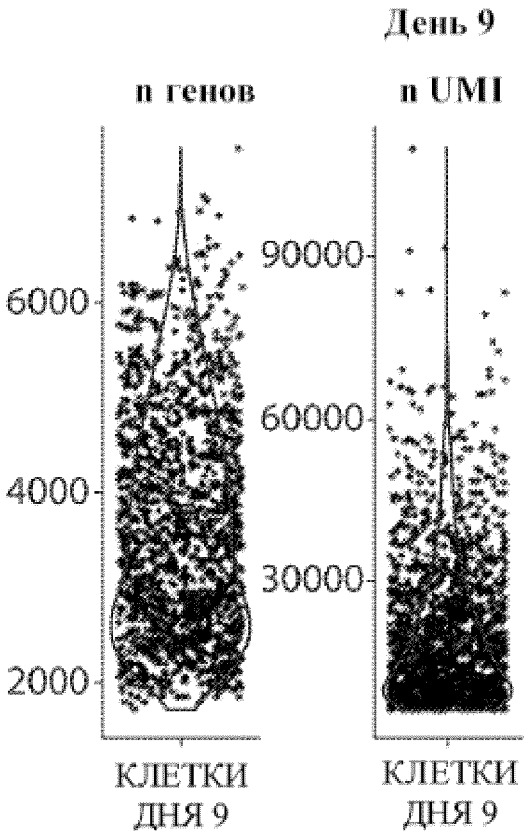




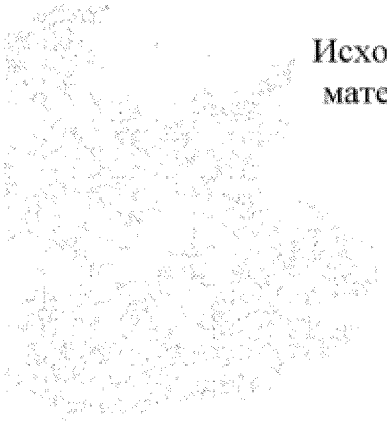
ФИГ. 37A



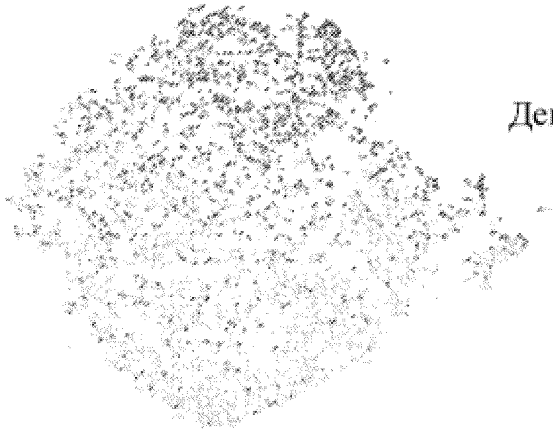
ФИГ. 37B



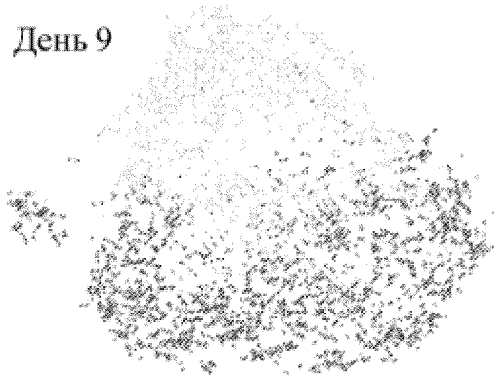
ФИГ. 37C



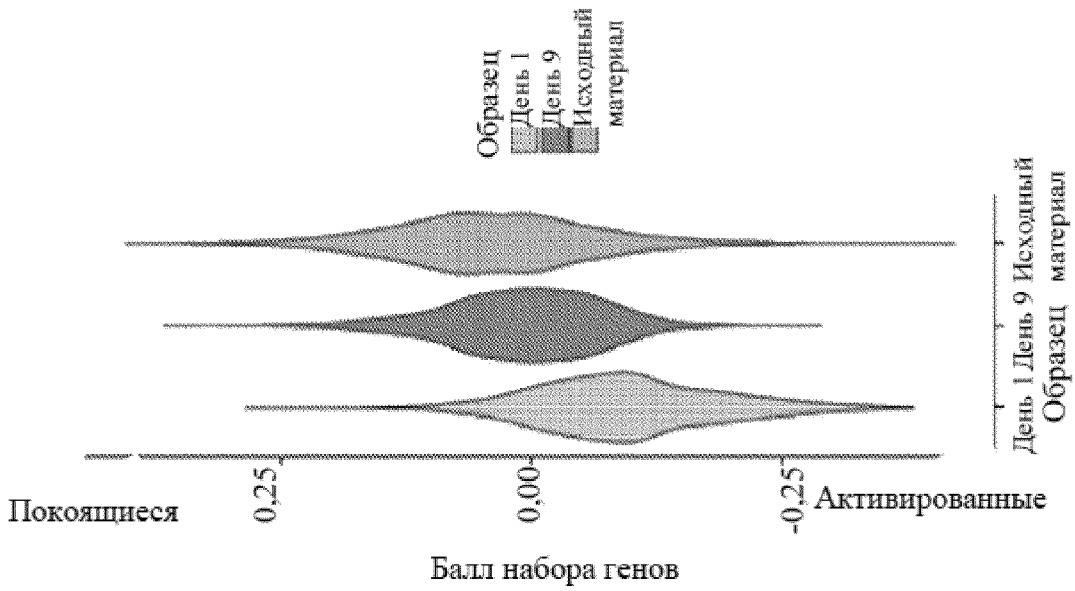
ФИГ. 38A



ФИГ. 38B



ФИГ. 38C

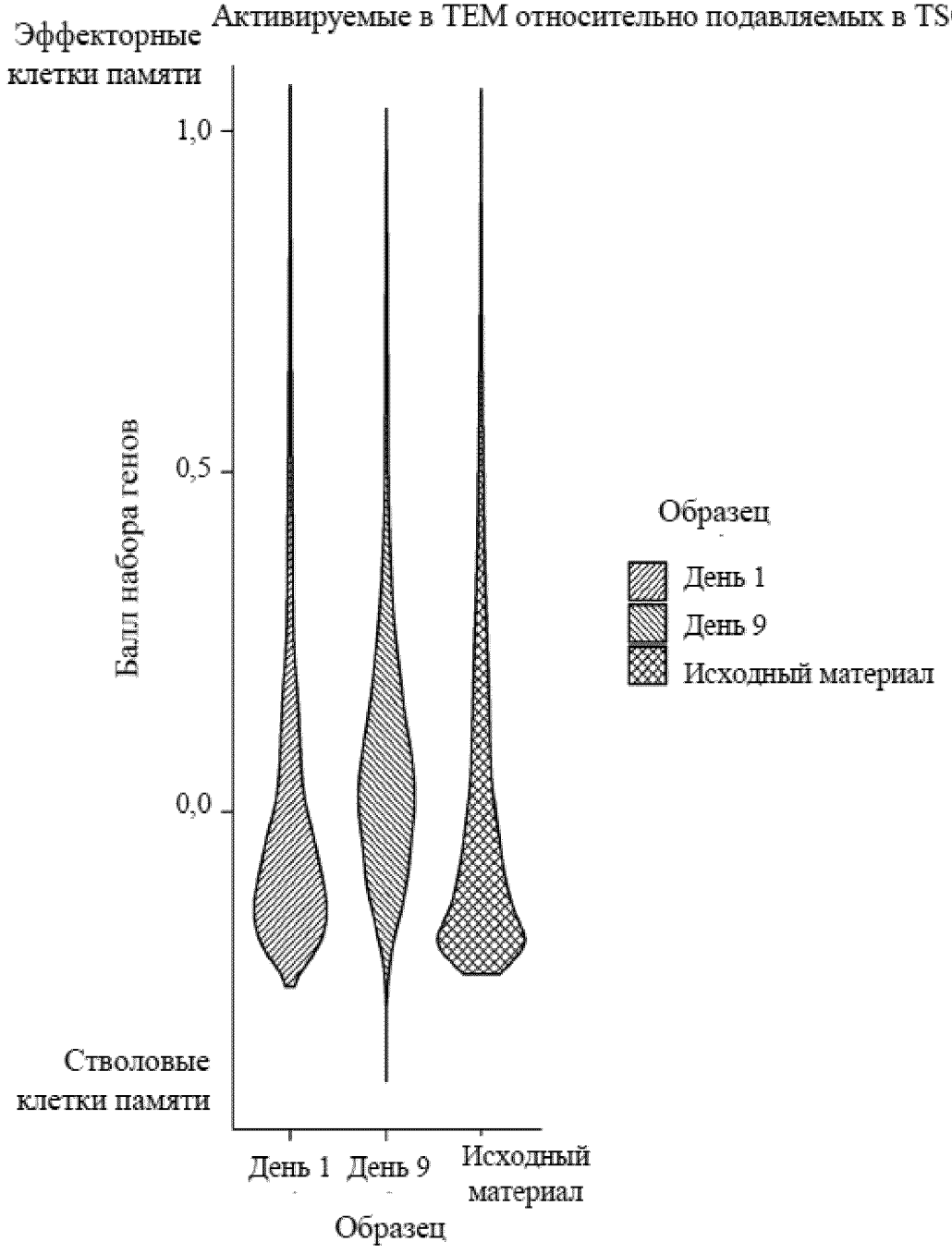

Образец
День 1
День 9
Исходный материал
День 1 День 9 Исходный
Образец материал
Покоящиеся
0,25
0,00
-0,25
Активированные
Балл набора генов

ФИГ. 38D

День 9: TEM

День 1 и исходный материал: TSCM

Активируемые в TEM относительно подавляемых в TSCM



Медианные значения:

D1: -0,084

D9: 0,035

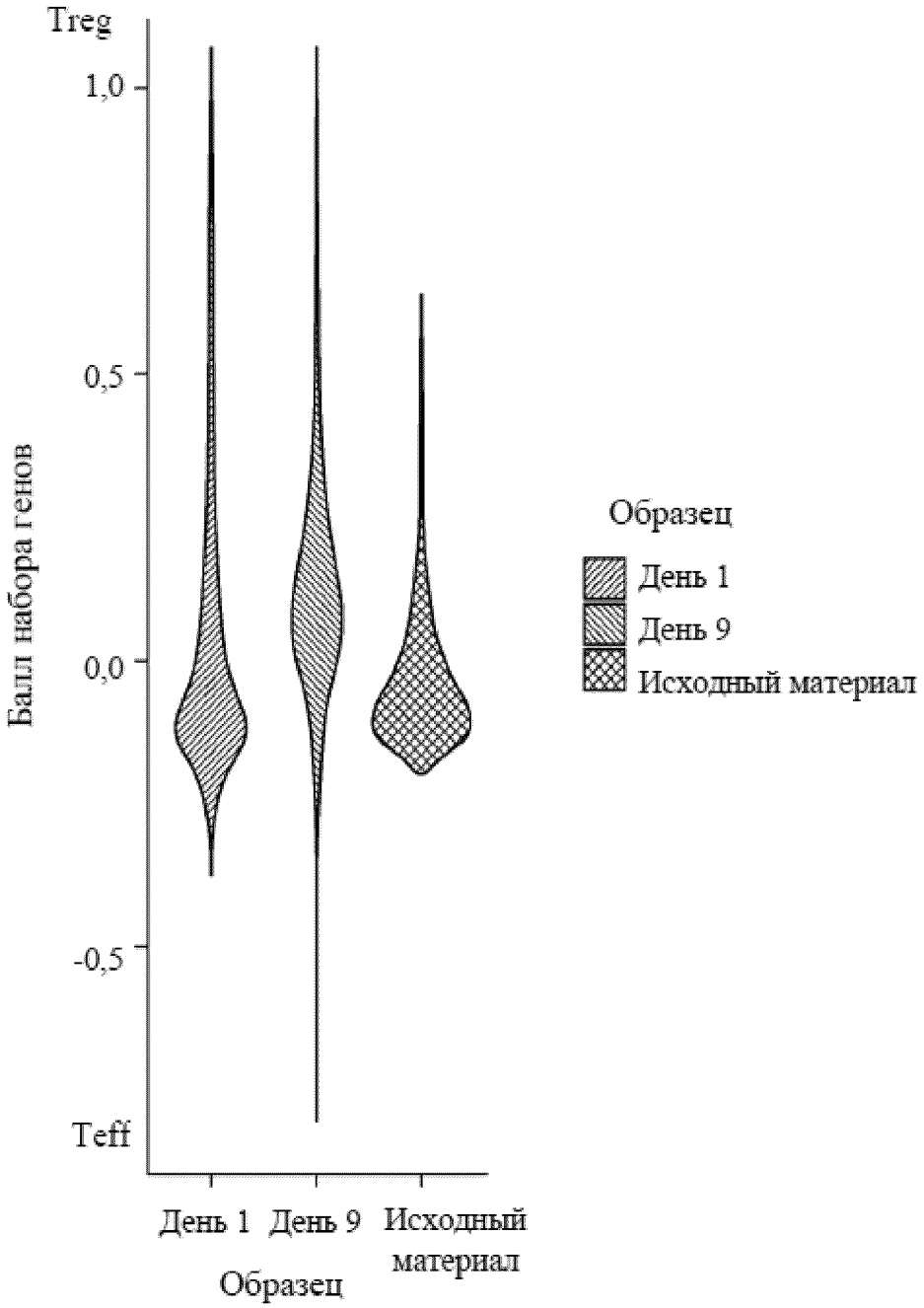
Исходный материал: -0,1

ФИГ. 39A

День 9: Treg

День 1 и исходный материал: Teff

Активируемые в Treg относительно подавляемых в Teff



Медианные значения:

D1: -0,082

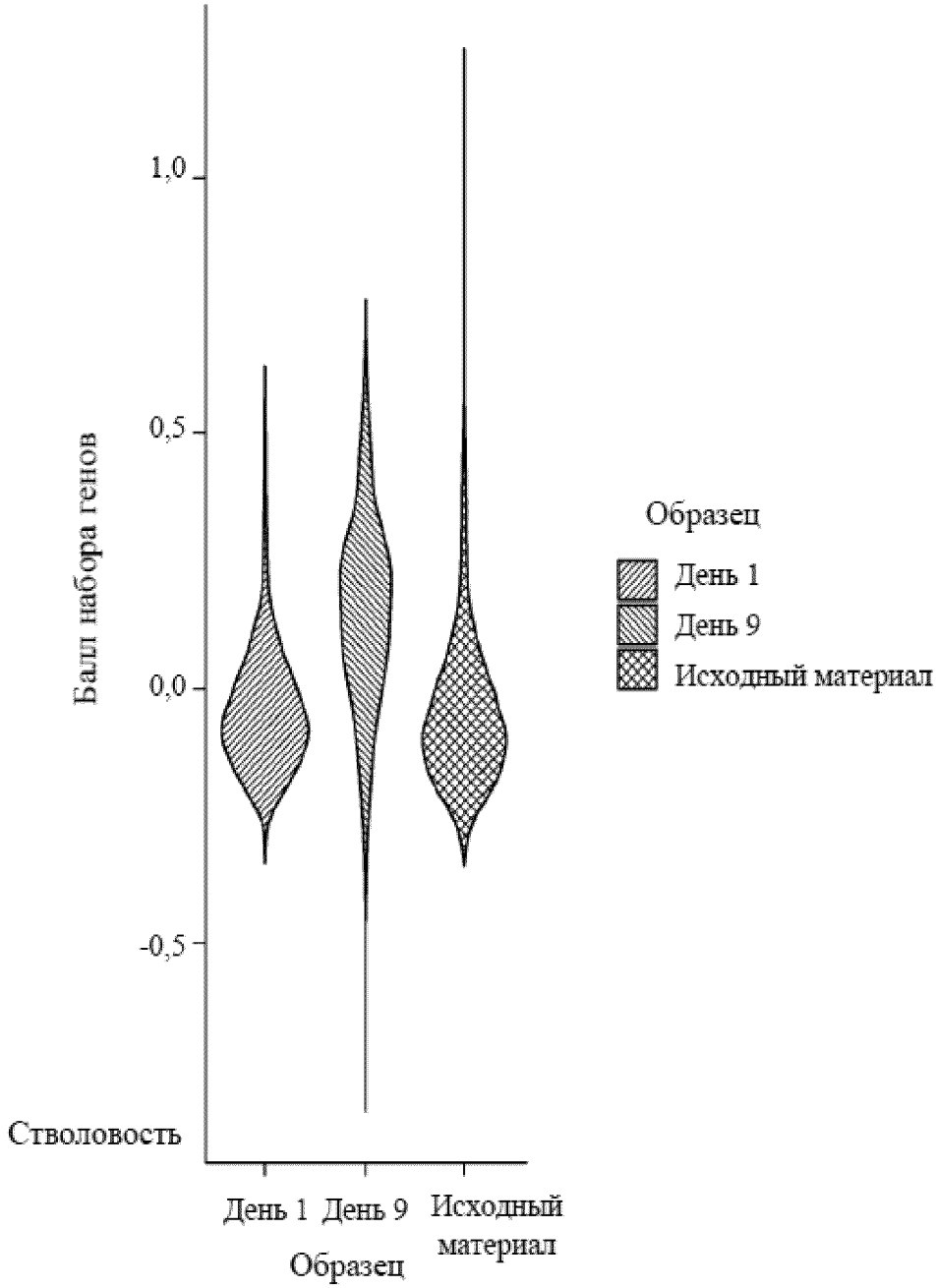
D9: 0,087

Исходный материал: -0,071

ФИГ. 39B

День 1 и исходный материал: гемопоэтические клетки, подобные стволовым клеткам

Подавляемые в состоянии стволовости



Медианные значения:

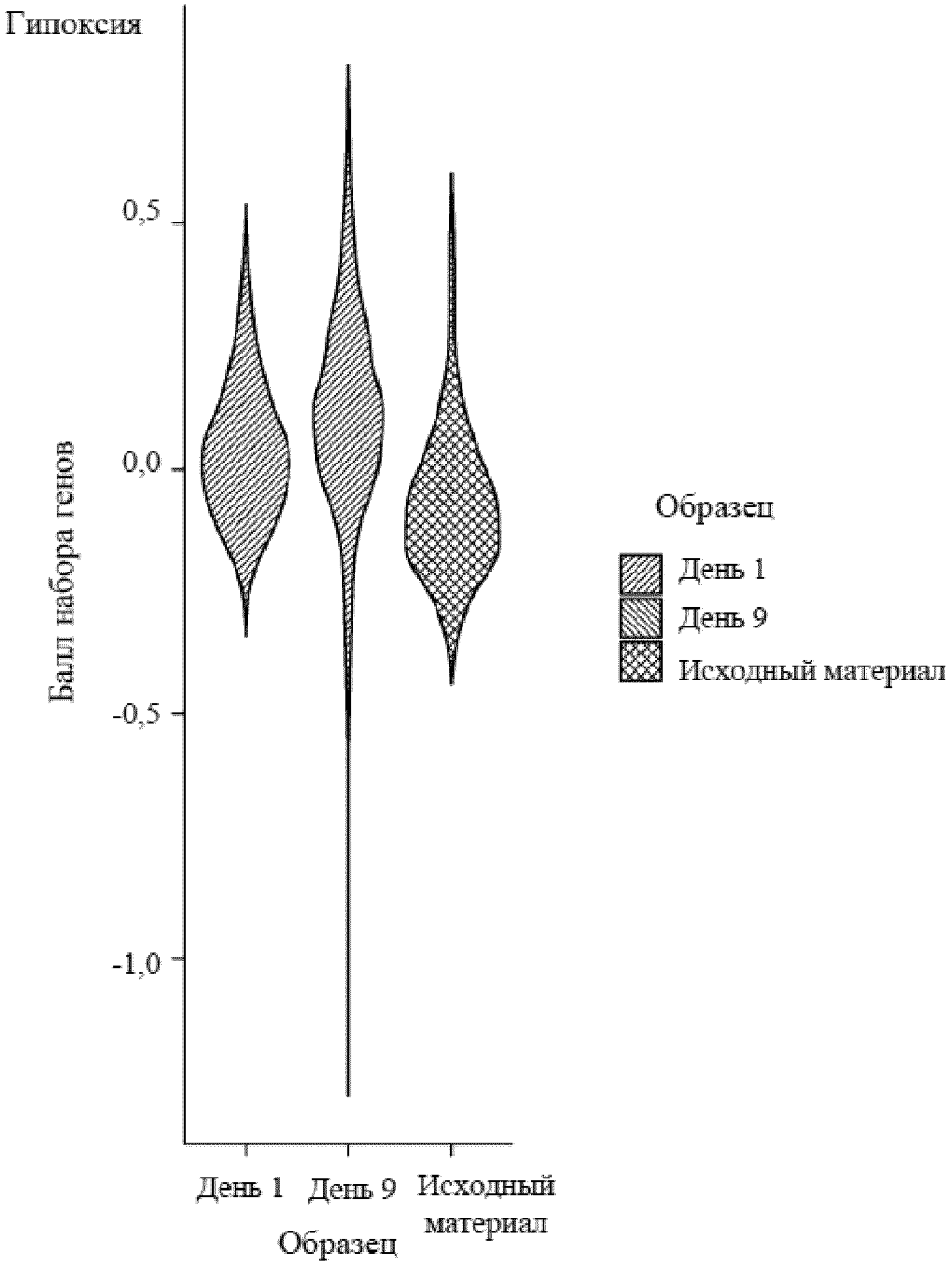
D1: -0,062

D9: 0,14

Исходный материал: -0,081

ФИГ. 39C

АКТИВИРУЕМЫЕ ПРИ ГИПОКСИИ ПО HARRIS



Медианные значения:

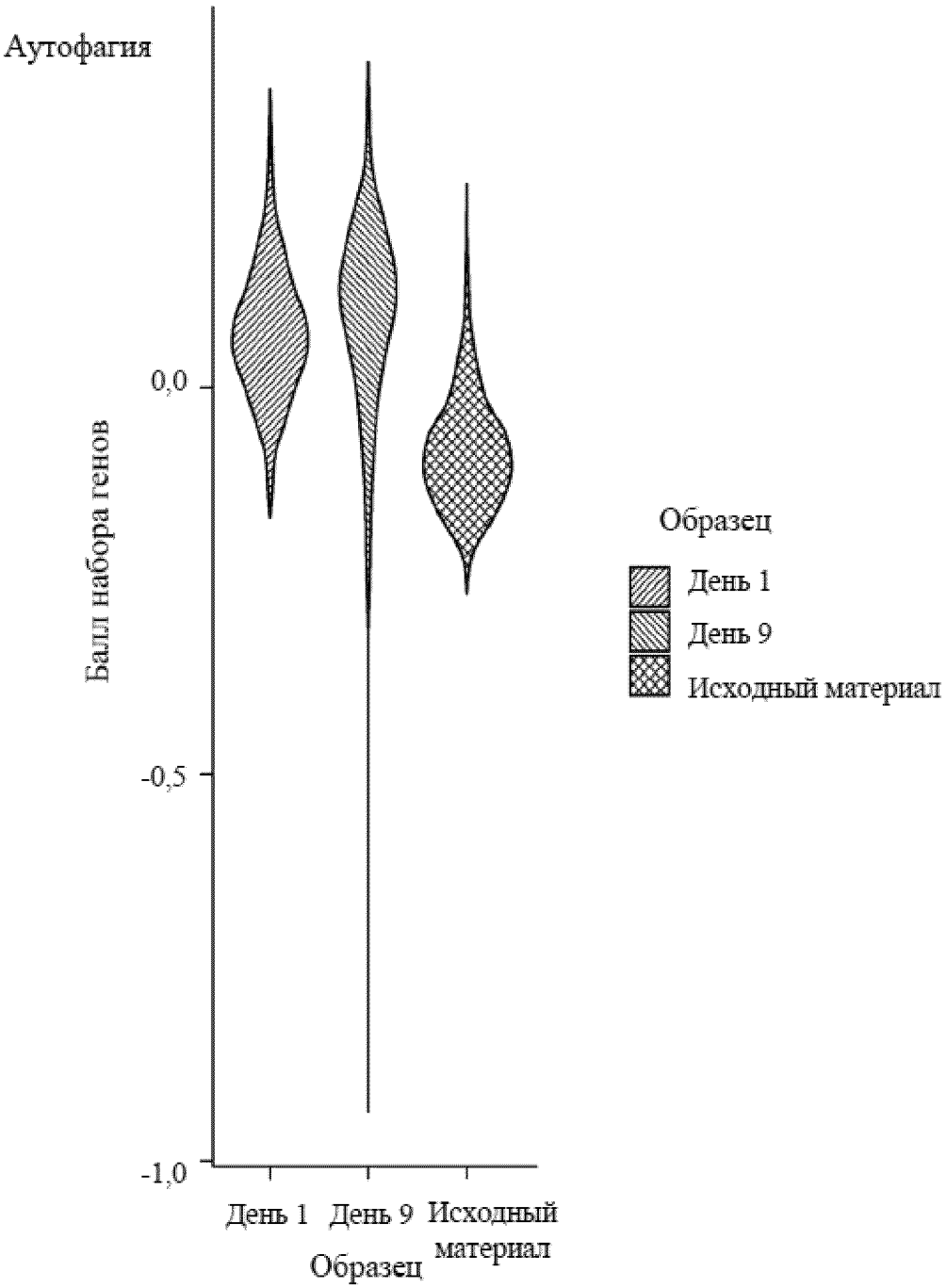
D1: 0,019

D9: 0,11

Исходный материал: -0,096

ФИГ. 39D

АКТИВИРУЕМЫЕ ПРИ АУТОФАГИИ ПО GO



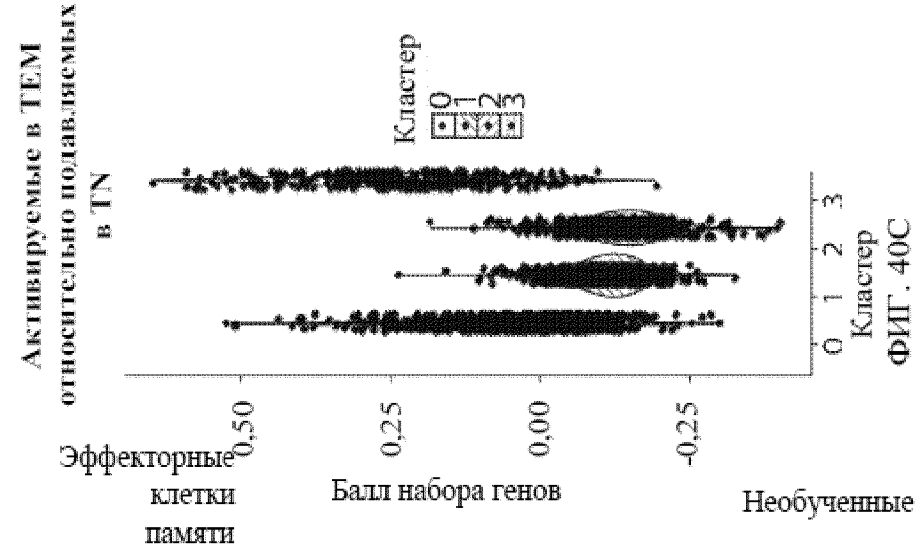
Медианные значения:

D1: 0,066

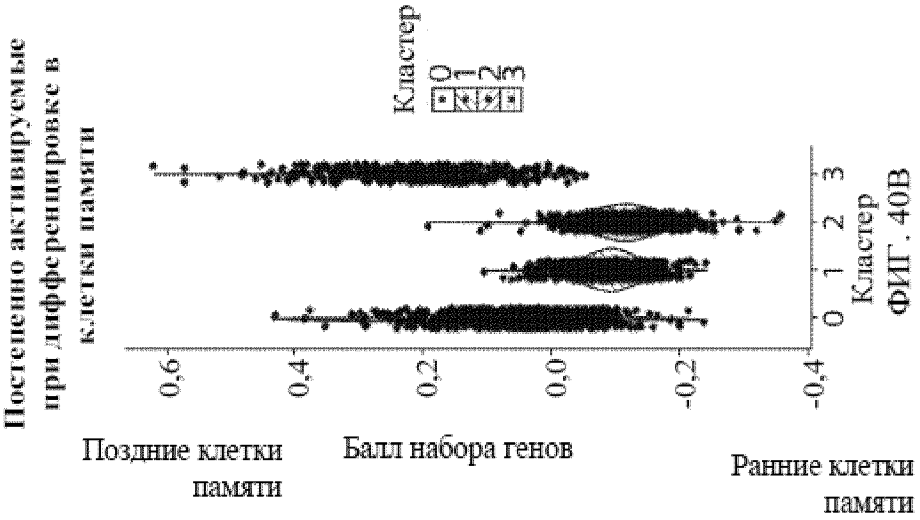
D9: 0,11

Исходный материал: -0,09

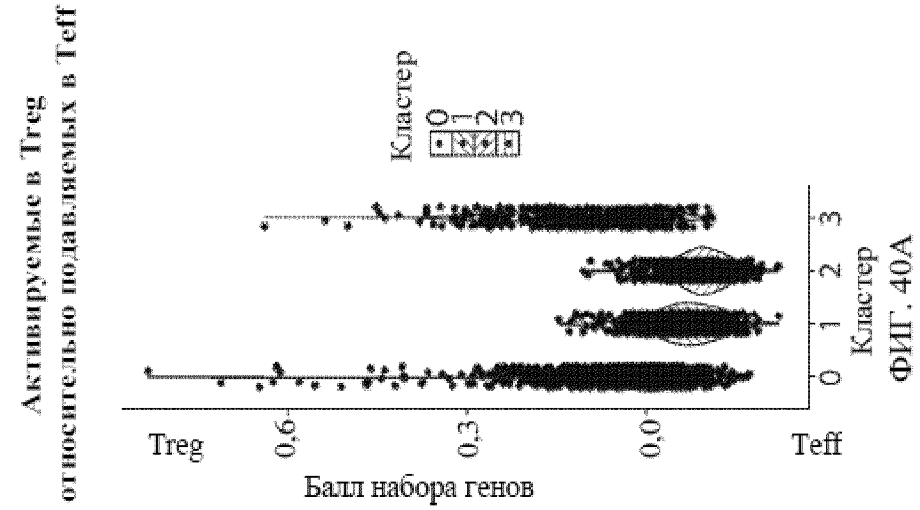
ФИГ. 39E



ФИГ. 40C



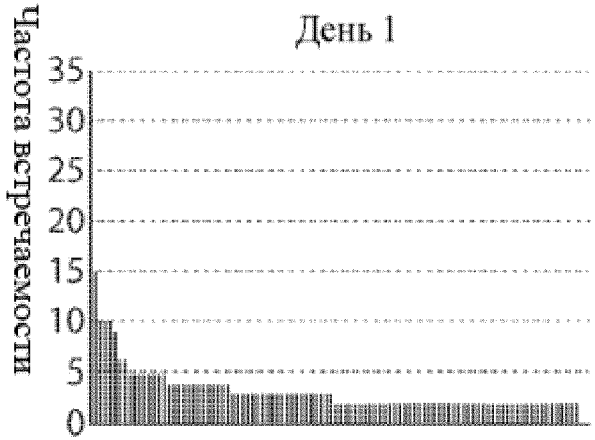
ФИГ. 40B



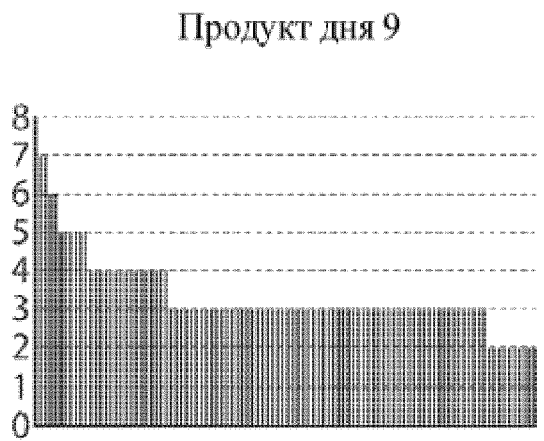
ФИГ. 40A



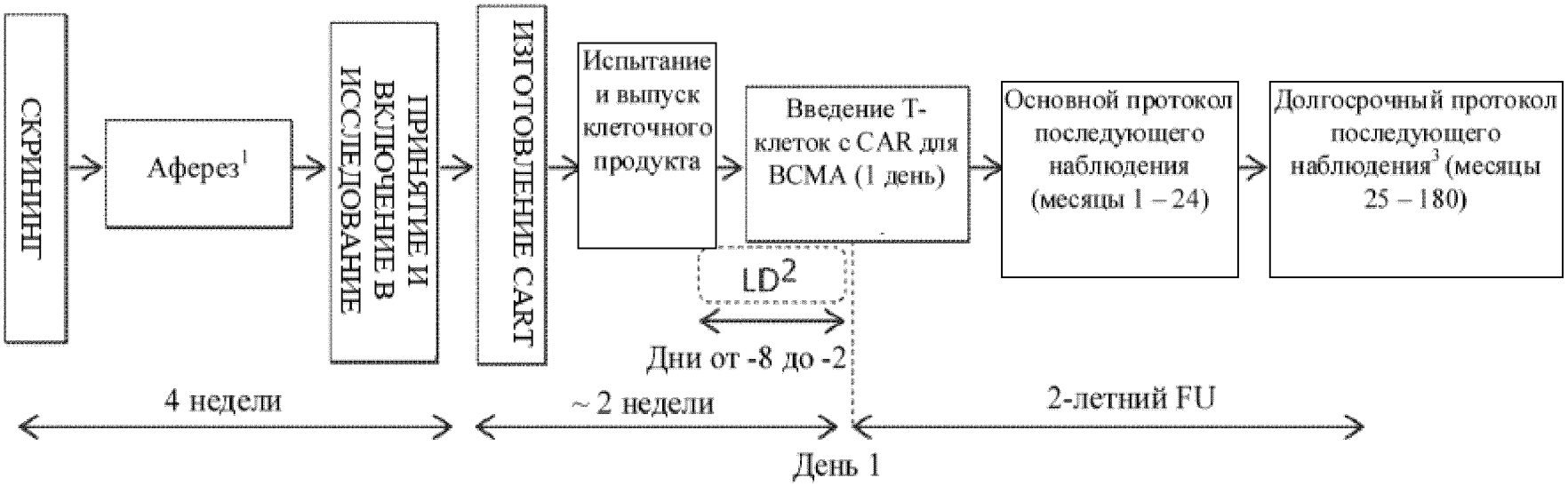
ФИГ. 41A



ФИГ. 41B



ФИГ. 41C

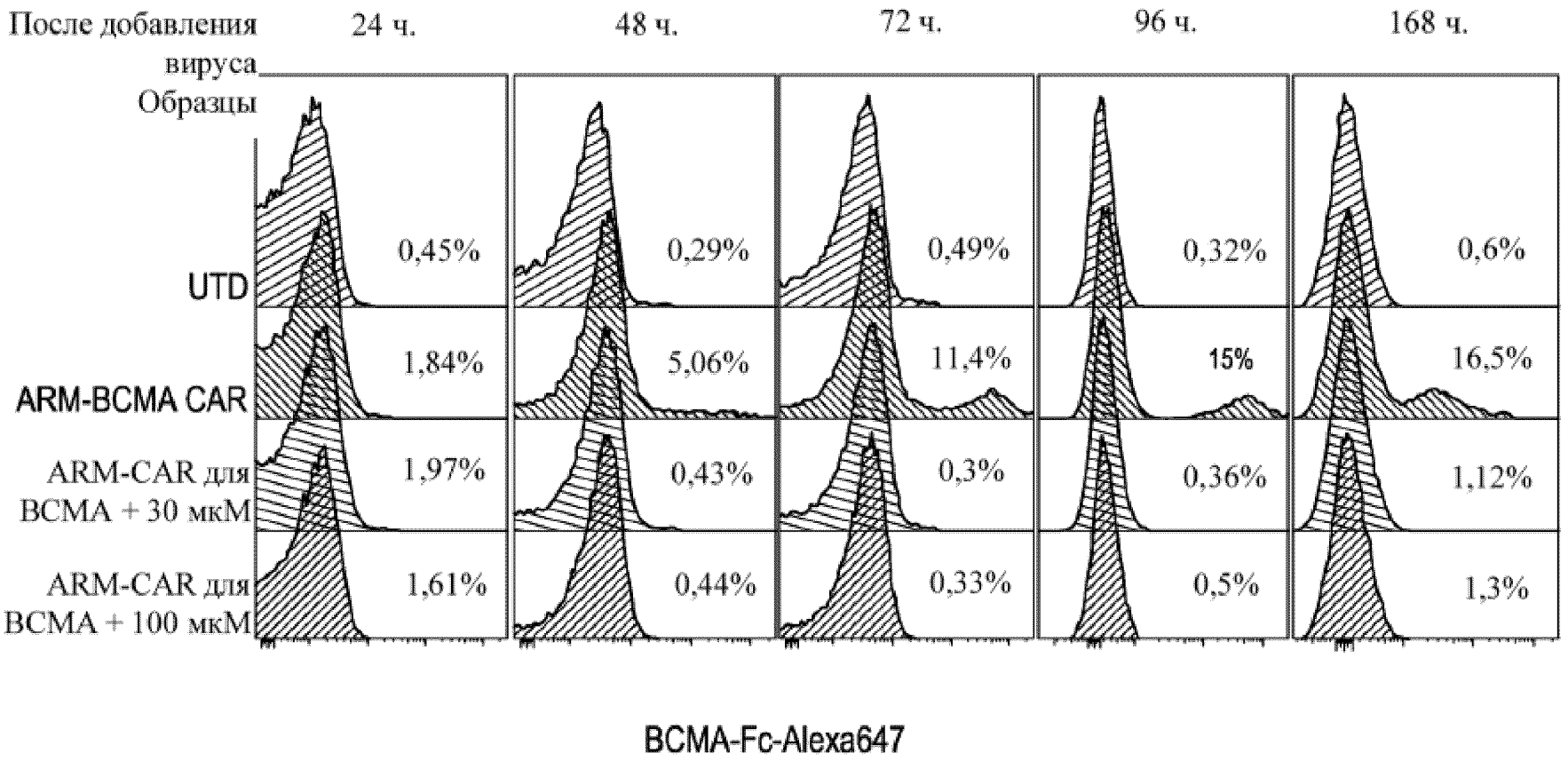


1 Можно использовать исторический собранный материал, полученный путем афереза

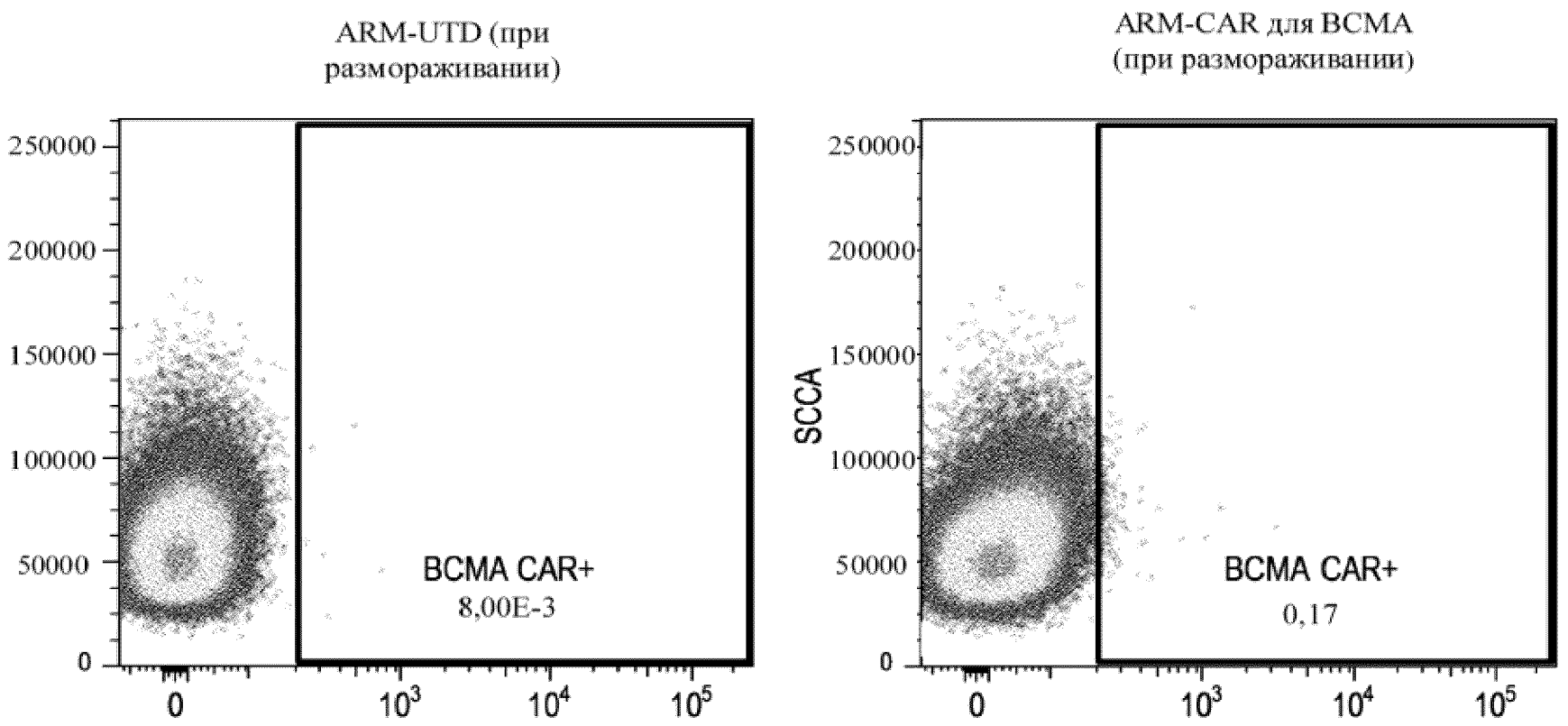
2 Лимфодеплеция (LD) с использованием флударабина/циклофосфамида, проводимая в течение 3 последовательных дней в рамках периода от дня -8 до дня -2 перед введением Т-клеток с CAR для BCMA

3 Долгосрочный протокол последующего наблюдения, проводимый согласно отдельному протоколу в соответствии с указаниями органа здравоохранения

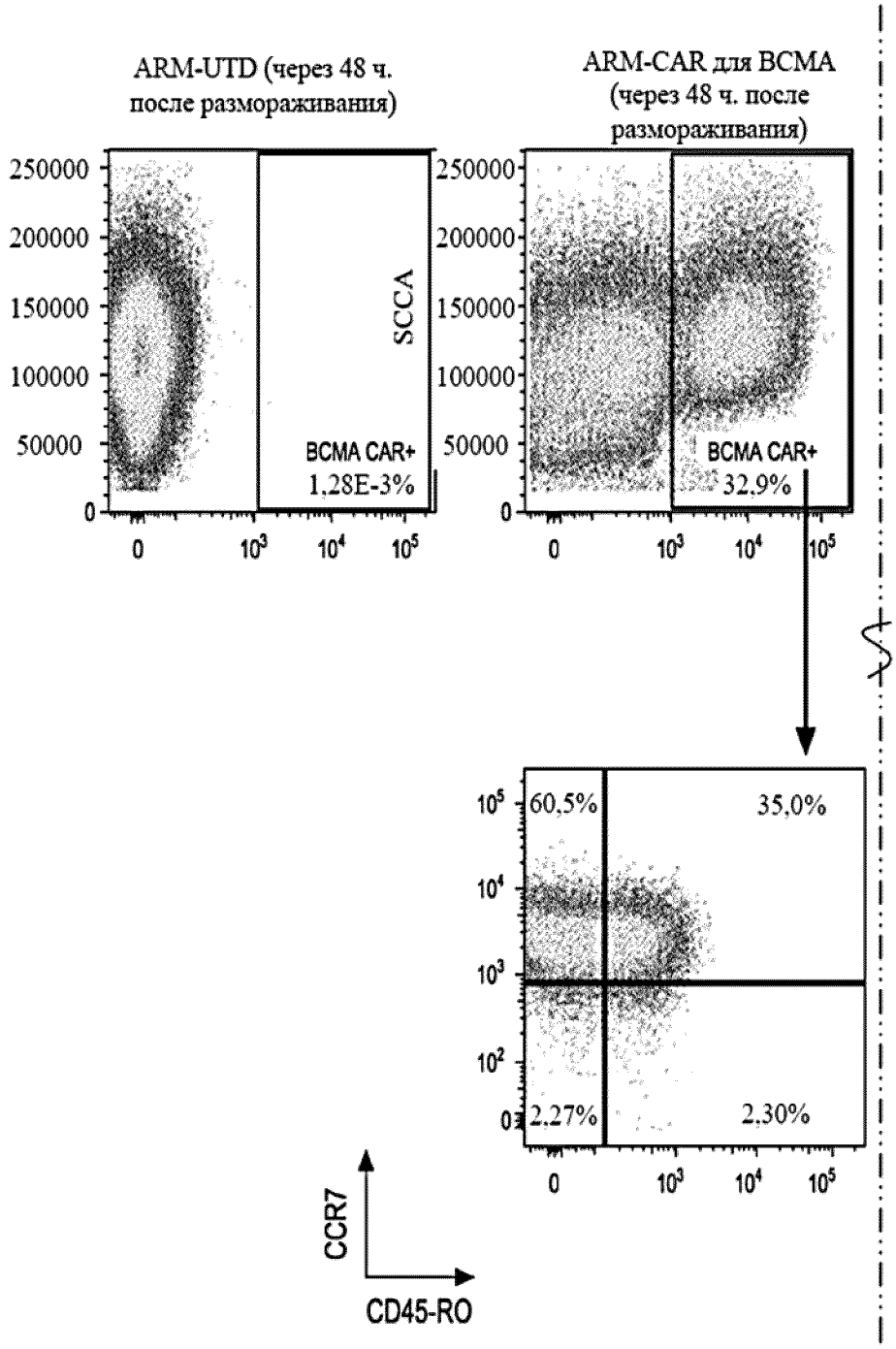
ФИГ. 42


После добавления вируса
24 ч.
48 ч.
72 ч.
96 ч.
168 ч.
Образцы
UTD
ARM-BCMA CAR
ARM-CAR для BCMA + 30 мкМ
ARM-CAR для BCMA + 100 мкМ
0,45%
0,29%
0,49%
0,32%
0,6%
1,84%
5,06%
11,4%
15%
16,5%
1,97%
0,43%
0,3%
0,36%
1,12%
1,61%
0,44%
0,33%
0,5%
1,3%
BCMA-Fc-Alexa647

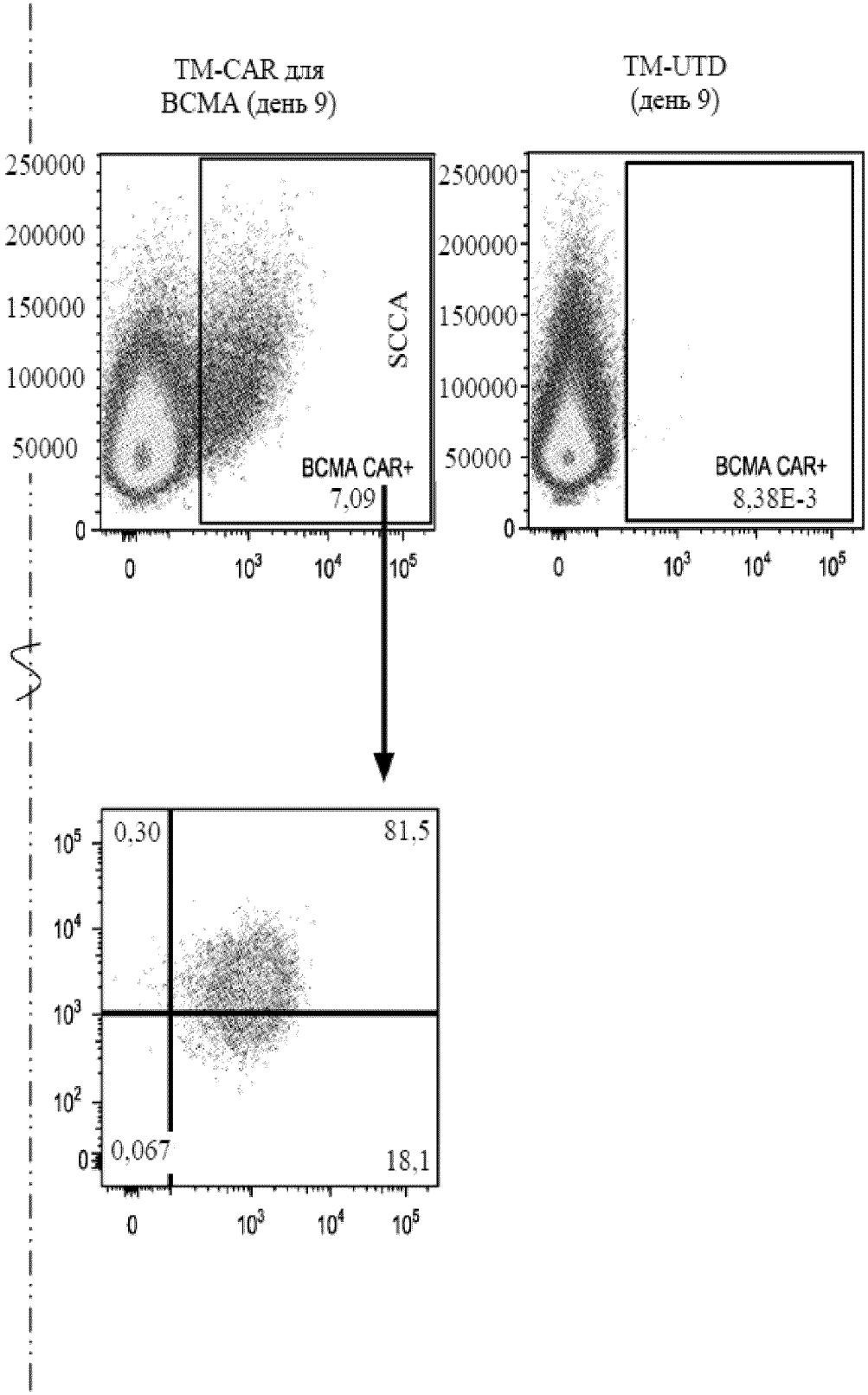
ФИГ. 43


ARM-UTD (при размораживании)
ARM-CAR для BCMA (при размораживании)
SCCA
250000
200000
150000
100000
50000
0
BCMA CAR+
8,00E-3
BCMA CAR+
0,17
0
10^3
10^4
10^5

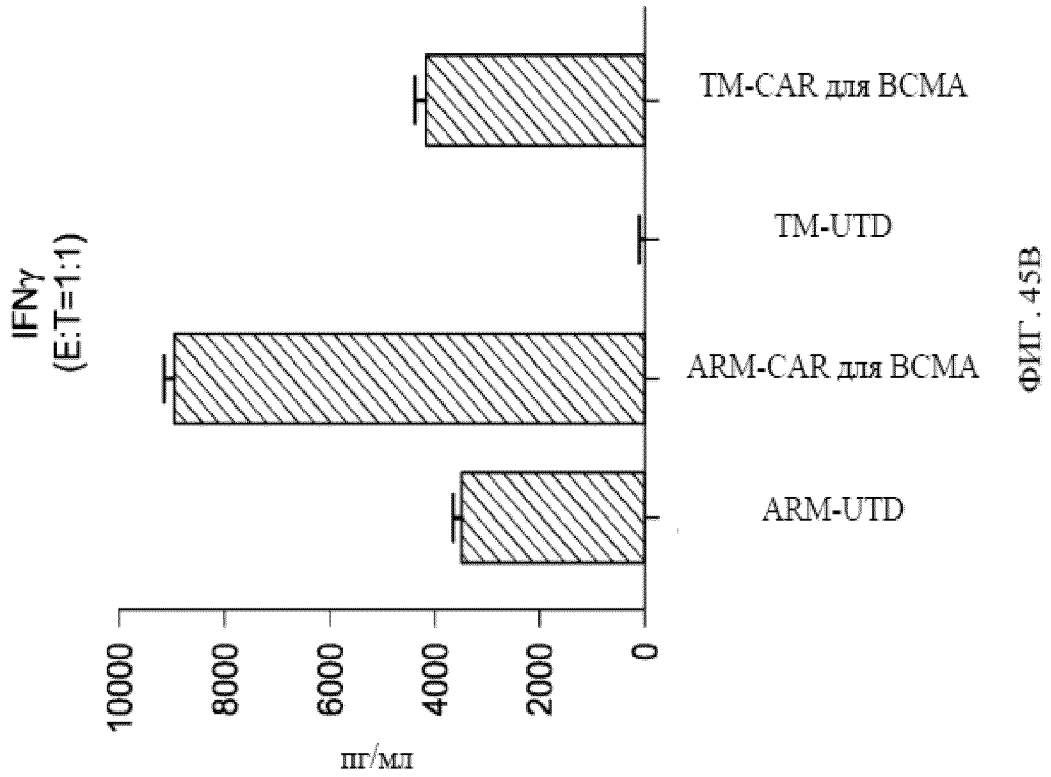
ФИГ. 44A



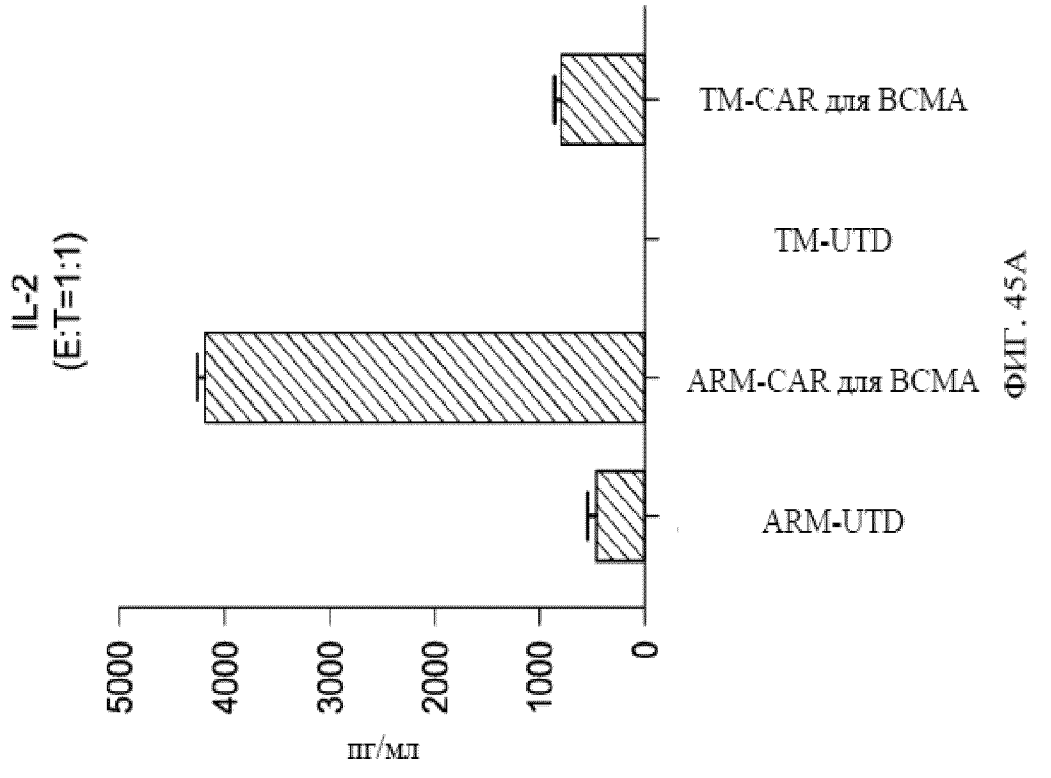
ФИГ. 44В (часть 1)



ФИГ. 44B (часть 2)



ФИГ. 45B

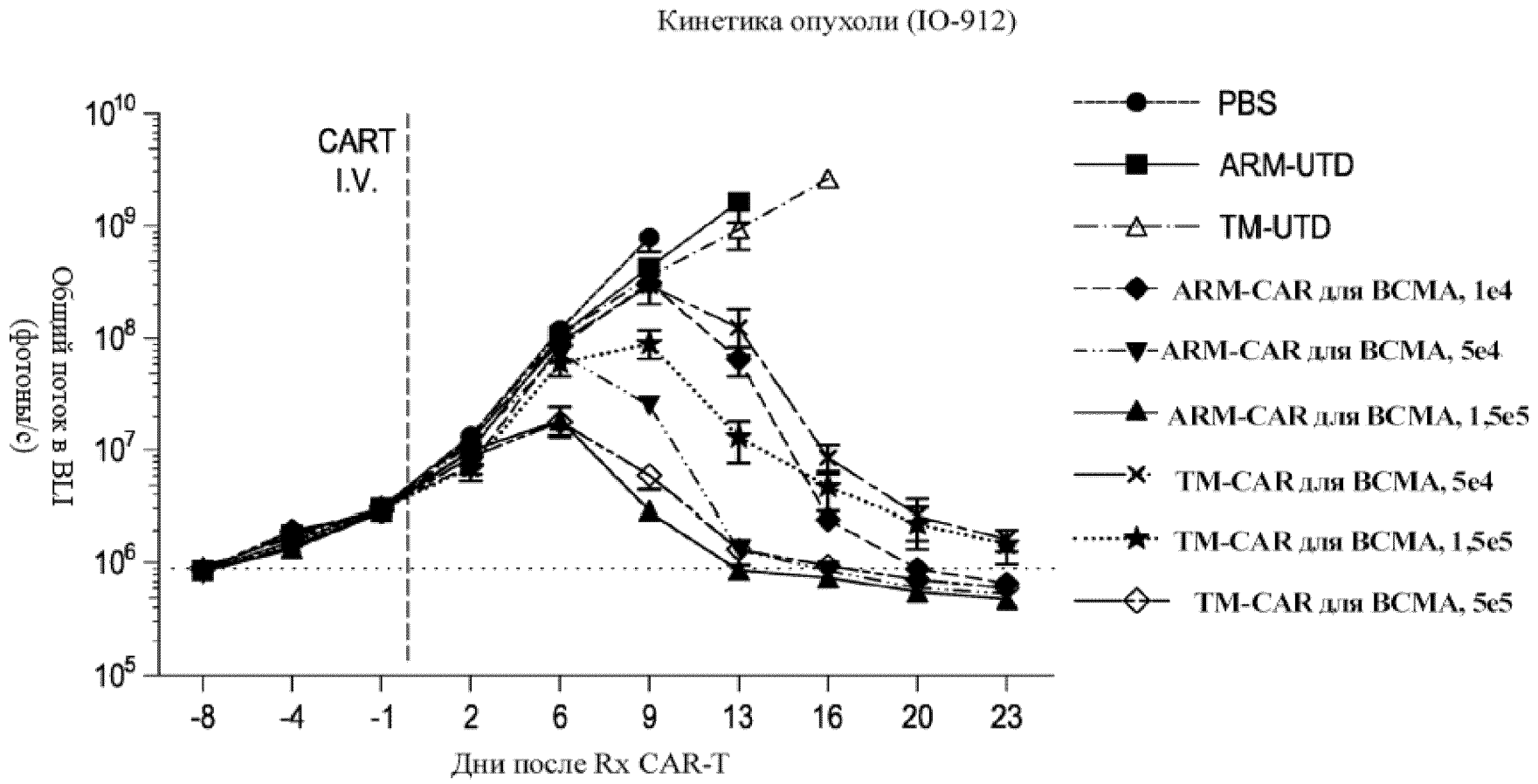


ФИГ. 45A

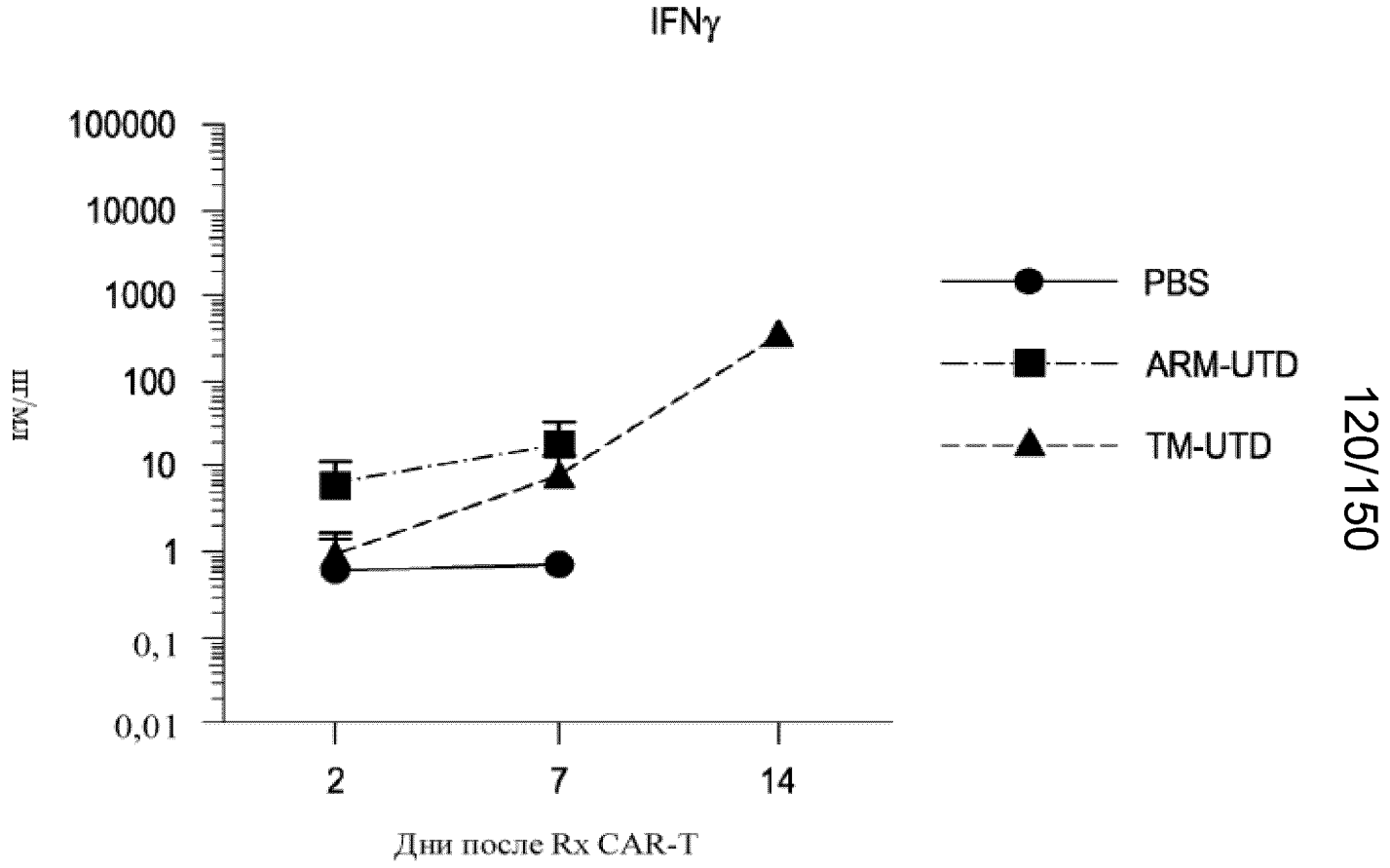
ФИГ. 46

Общая схема исследования эффективности с ксенотрансплантацией для тестирования ARM-CAR для BCMA

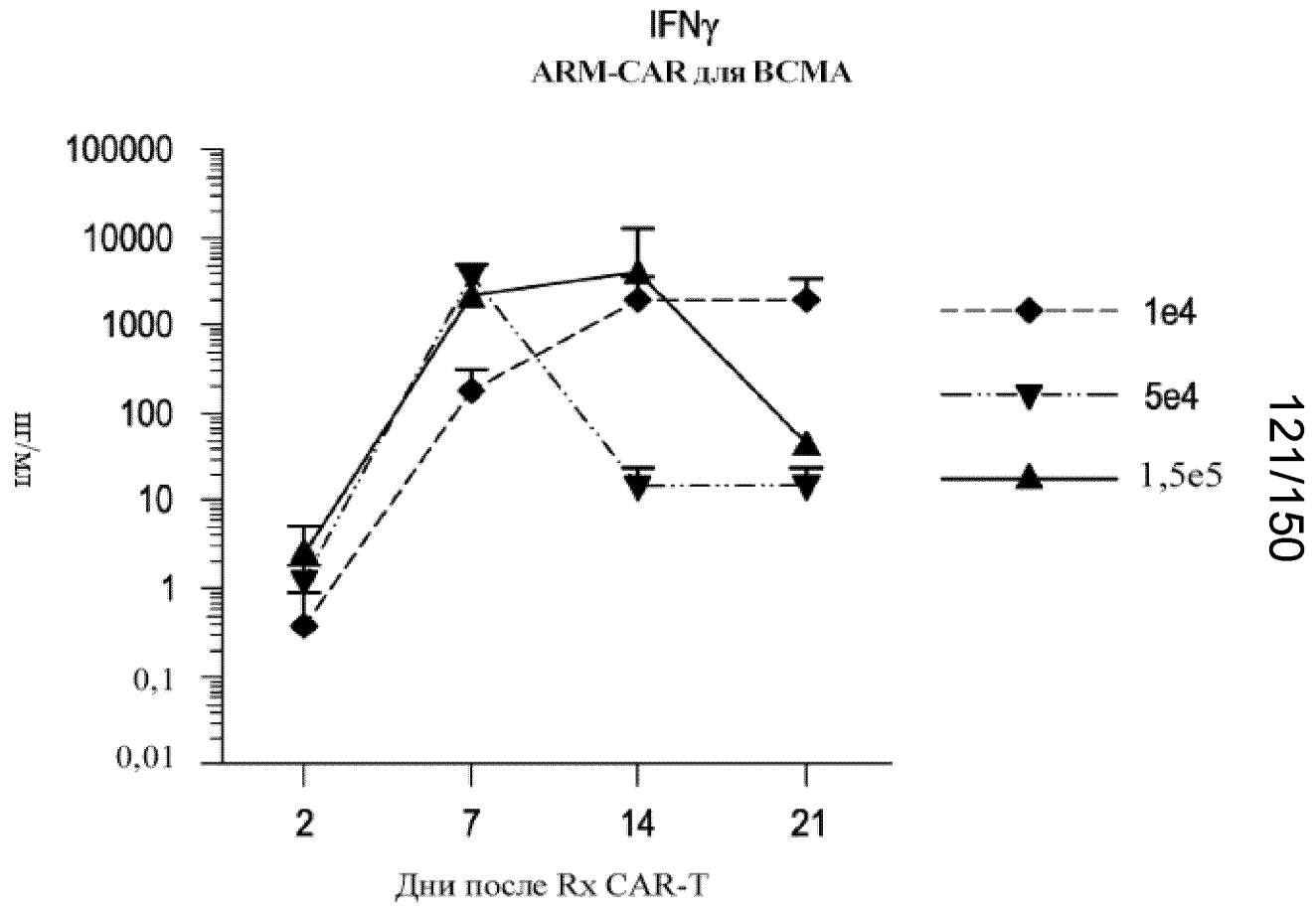



Кинетика опухоли (IO-912)
CART
I.V.
Общий поток в BLI
(фотоны/с)
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
-8
-4
-1
2
6
9
13
16
20
23
Дни после Rx CAR-T
PBS
ARM-UTD
TM-UTD
ARM-CAR для BCMA, 1e4
ARM-CAR для BCMA, 5e4
ARM-CAR для BCMA, 1,5e5
TM-CAR для BCMA, 5e4
TM-CAR для BCMA, 1,5e5
TM-CAR для BCMA, 5e5

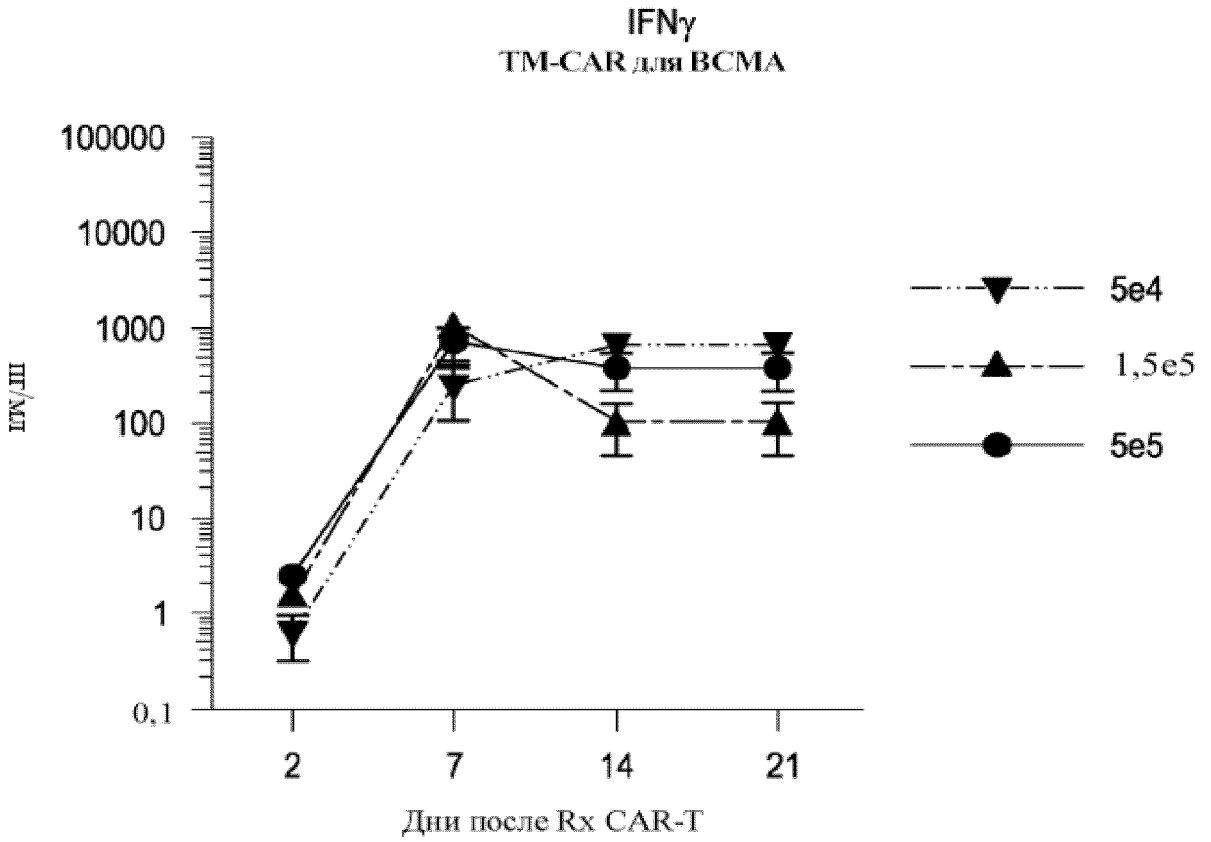
ФИГ. 47


IFNγ
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
пг/мл
2
7
14
Дни после Rx CAR-T
PBS
ARM-UTD
TM-UTD

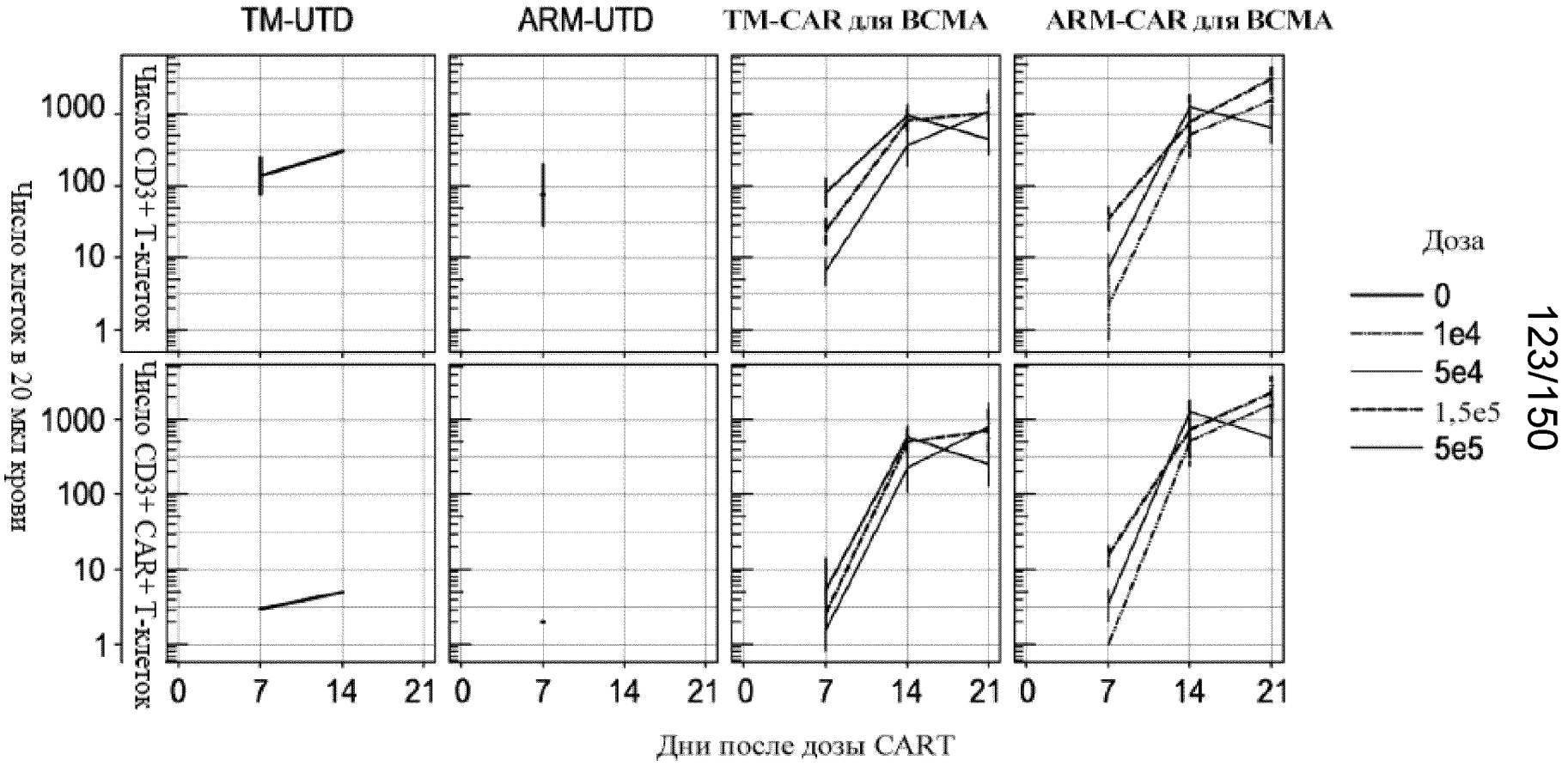
ФИГ. 48A


IFNγ
ARM-CAR для BCMA
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
0,01
пг/мл
2
7
14
21
Дни после Rx CAR-T
1e4
5e4
1,5e5

ФИГ. 48B

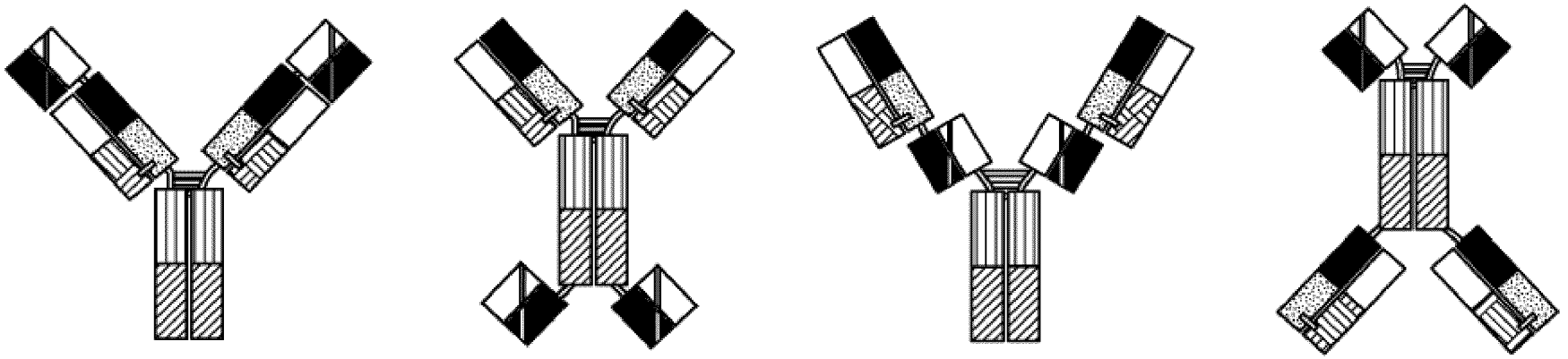

IFNγ
TM-CAR для BCMA
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
пг/мл
2
7
14
21
Дни после Rx CAR-T
5e4
1,5e5
5e5

ФИГ. 48C

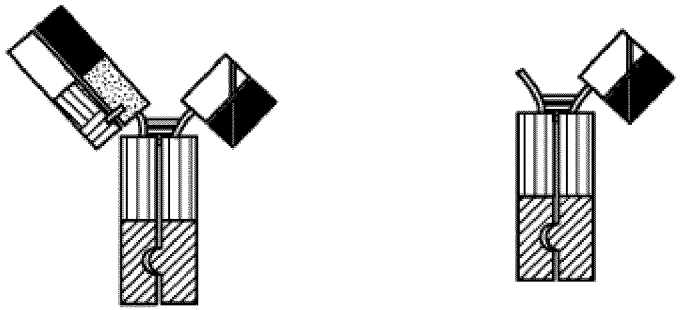

TM-UTD
ARM-UTD
TM-CAR для BCMA
ARM-CAR для BCMA
Число CD3+ Т-клеток
Число CD3+ CAR+ Т-клеток
Число клеток в 20 мкл крови
1000
100
10
1
0
7
14
21
Дни после дозы CART
Доза
0
1e4
5e4
1,5e5
5e5

ФИГ. 49

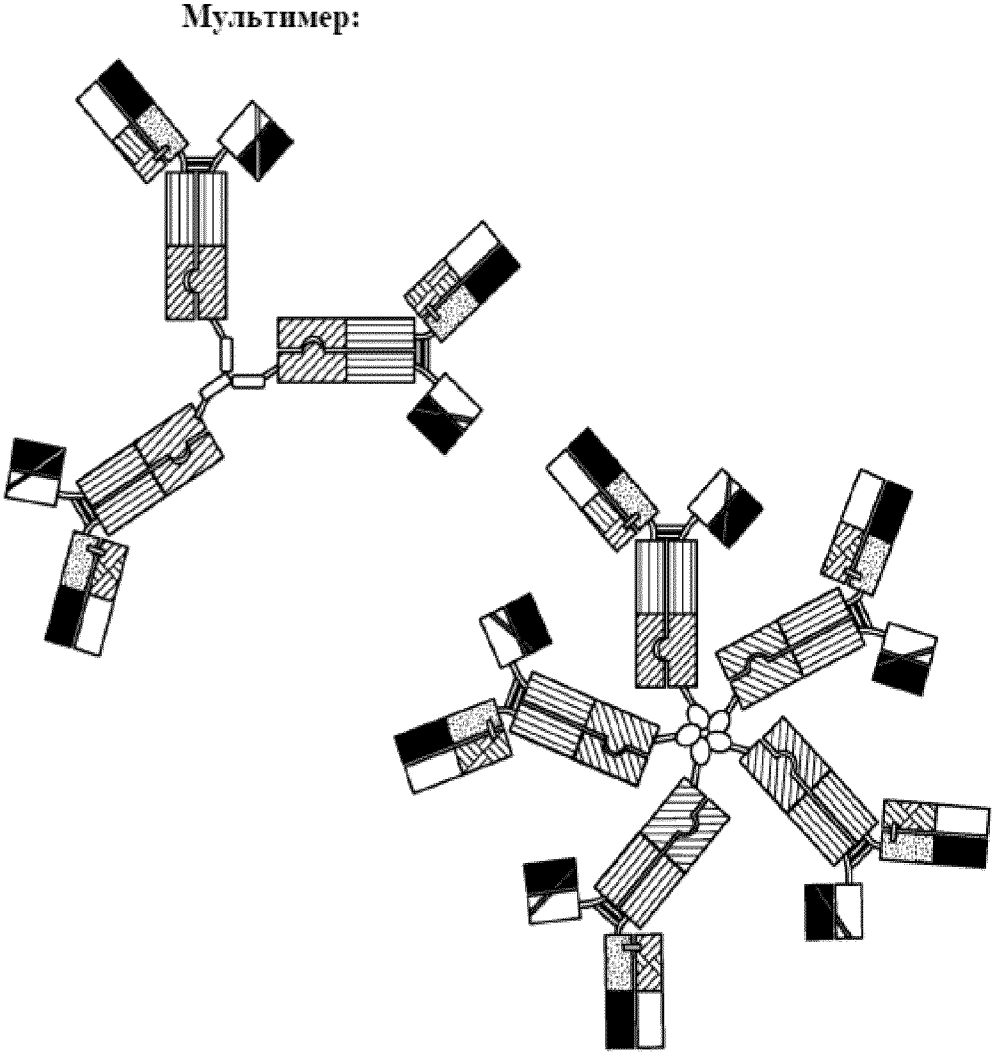
2+2:



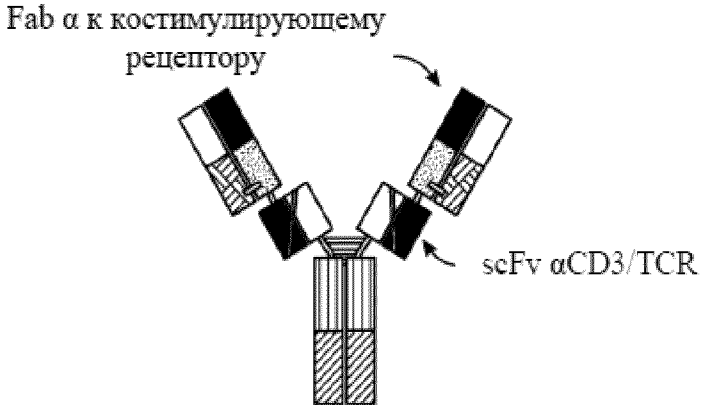
"Выступ во впадину" (KiH)



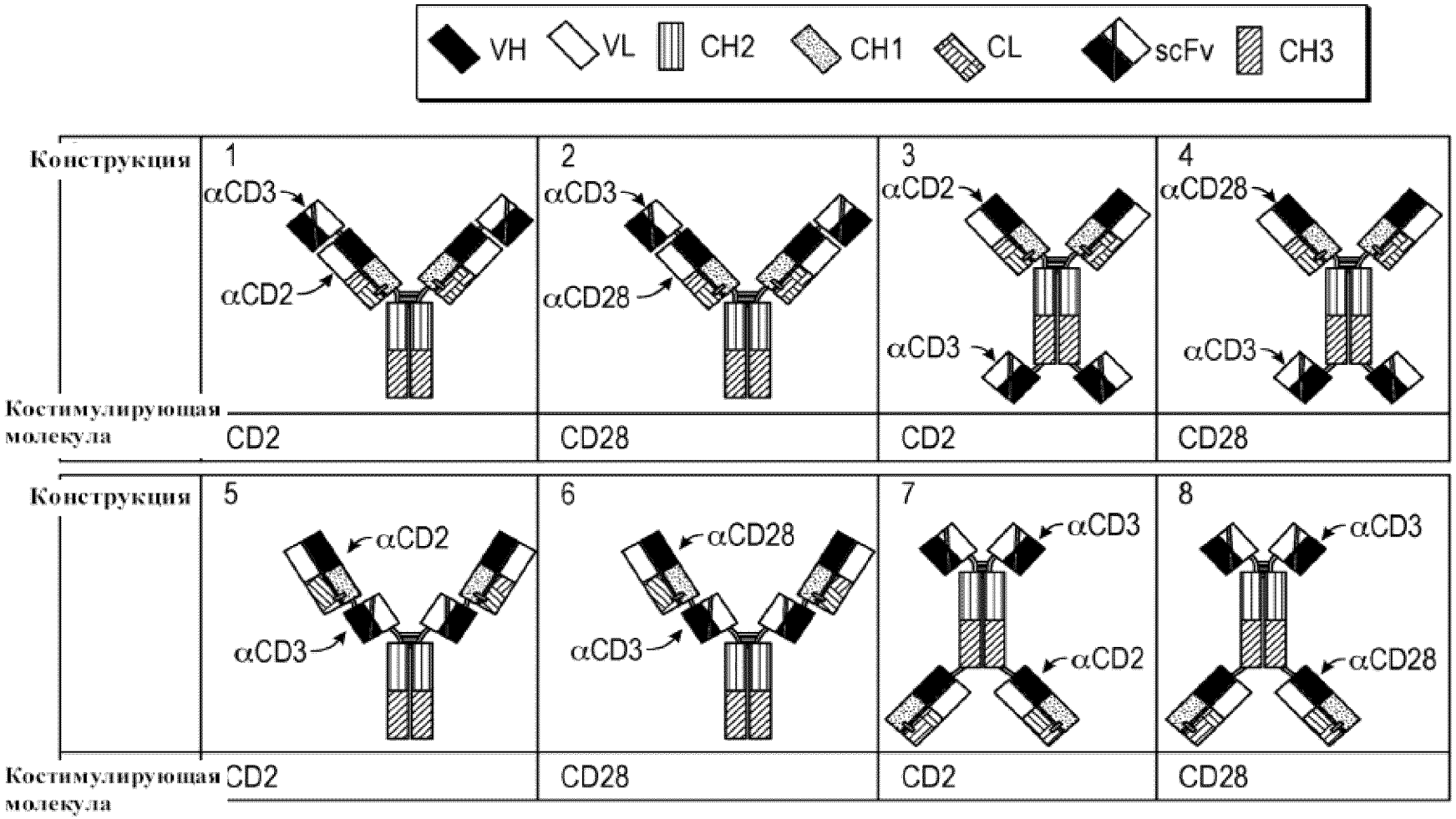
ФИГ. 50A



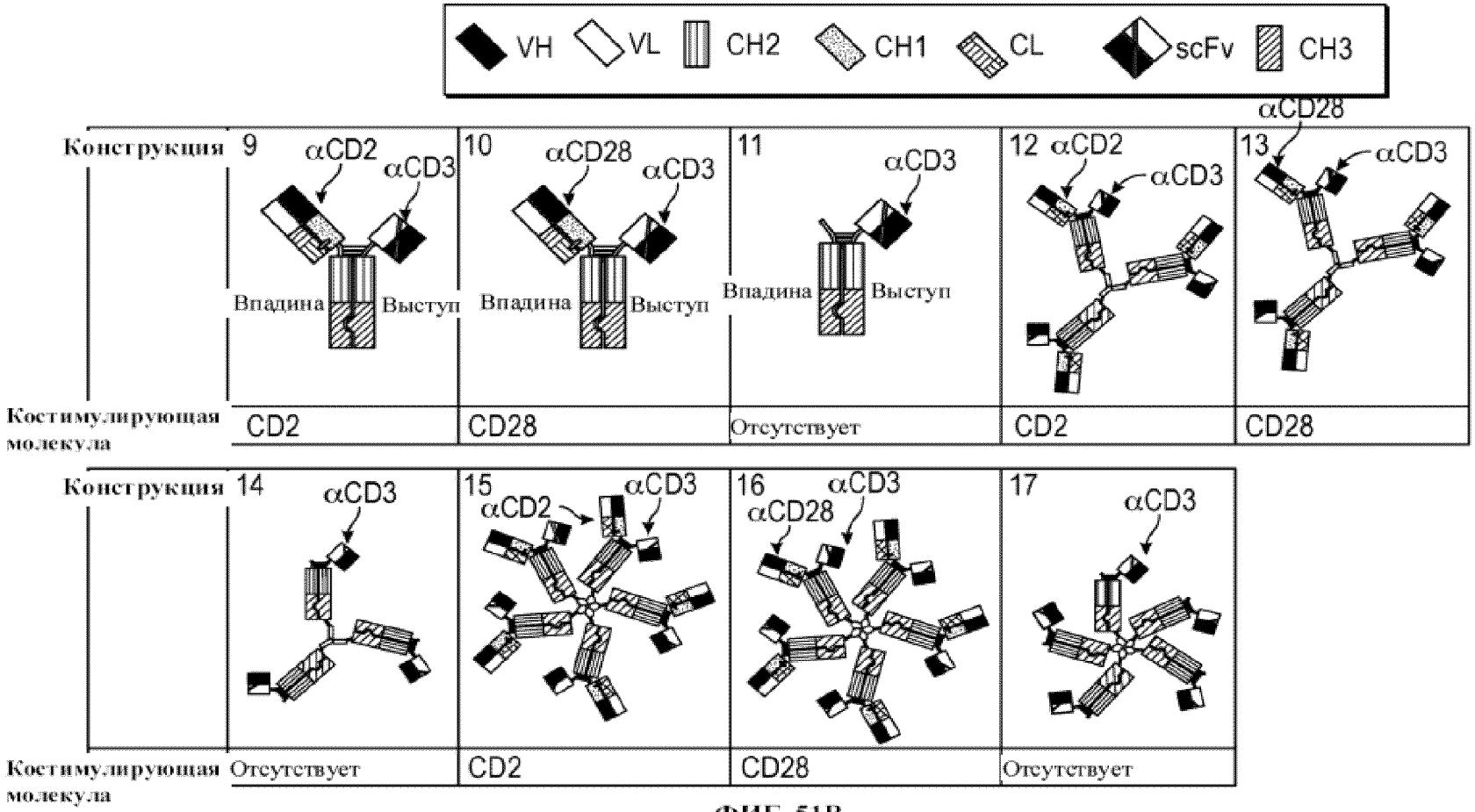
ФИГ. 50B



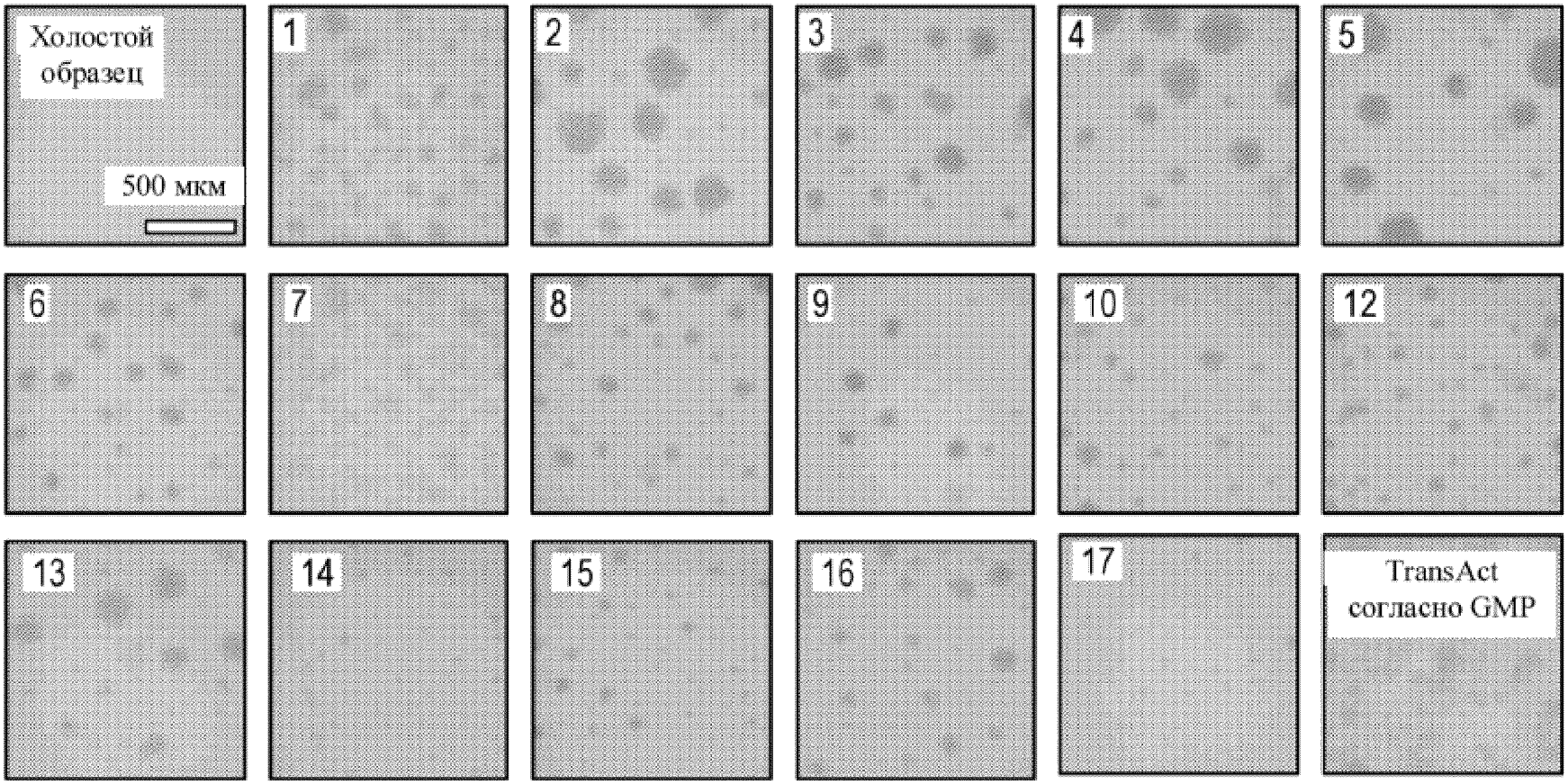
ФИГ. 50C


VH
VL
CH2
CH1
CL
scFv
CH3
Конструкция
1
αCD3
αCD2
2
αCD3
αCD28
3
αCD2
αCD3
4
αCD28
αCD3
Костимулирующая молекула
CD2
CD28
CD2
CD28
Конструкция
5
αCD2
αCD3
6
αCD28
αCD3
7
αCD3
αCD2
8
αCD3
αCD28
Костимулирующая молекула
CD2
CD28
CD2
CD28

ФИГ. 51A


VH
VL
CH2
CH1
CL
scFv
CH3
Конструкция
9
αCD2
αCD3
Впадина
Выступ
10
αCD28
αCD3
Впадина
Выступ
11
αCD3
Впадина
Выступ
12
αCD2
αCD3
13
αCD28
αCD3
Костимулирующая молекула
CD2
CD28
Отсутствует
CD2
CD28
Конструкция
14
αCD3
15
αCD2
αCD3
16
αCD28
αCD3
17
αCD3
Костимулирующая молекула
Отсутствует
CD2
CD28
Отсутствует

ФИГ. 51В

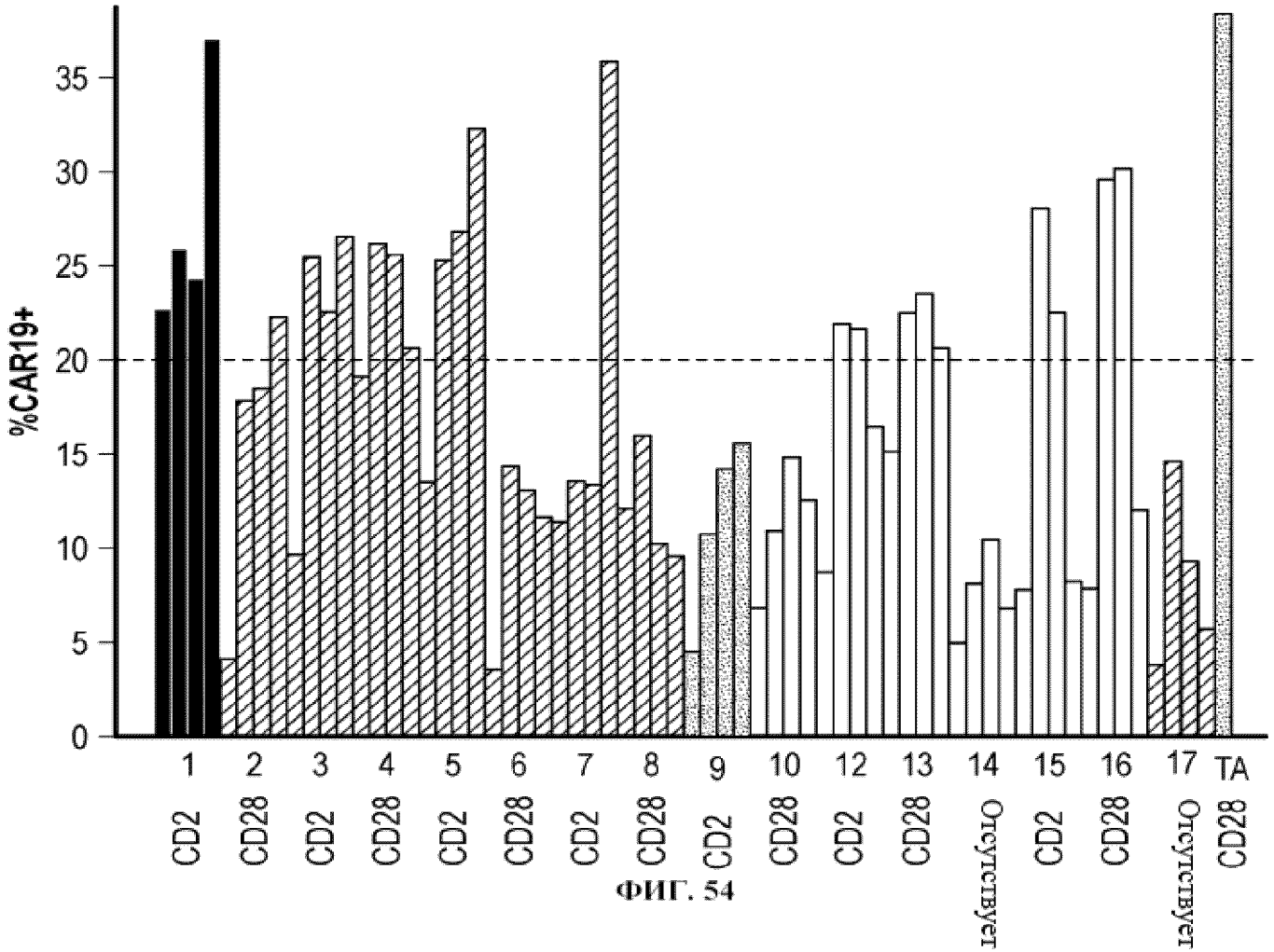

Холостой образец
500 мкм
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
12
13
14
15
16
17
TransAct согласно GMP

ФИГ. 52

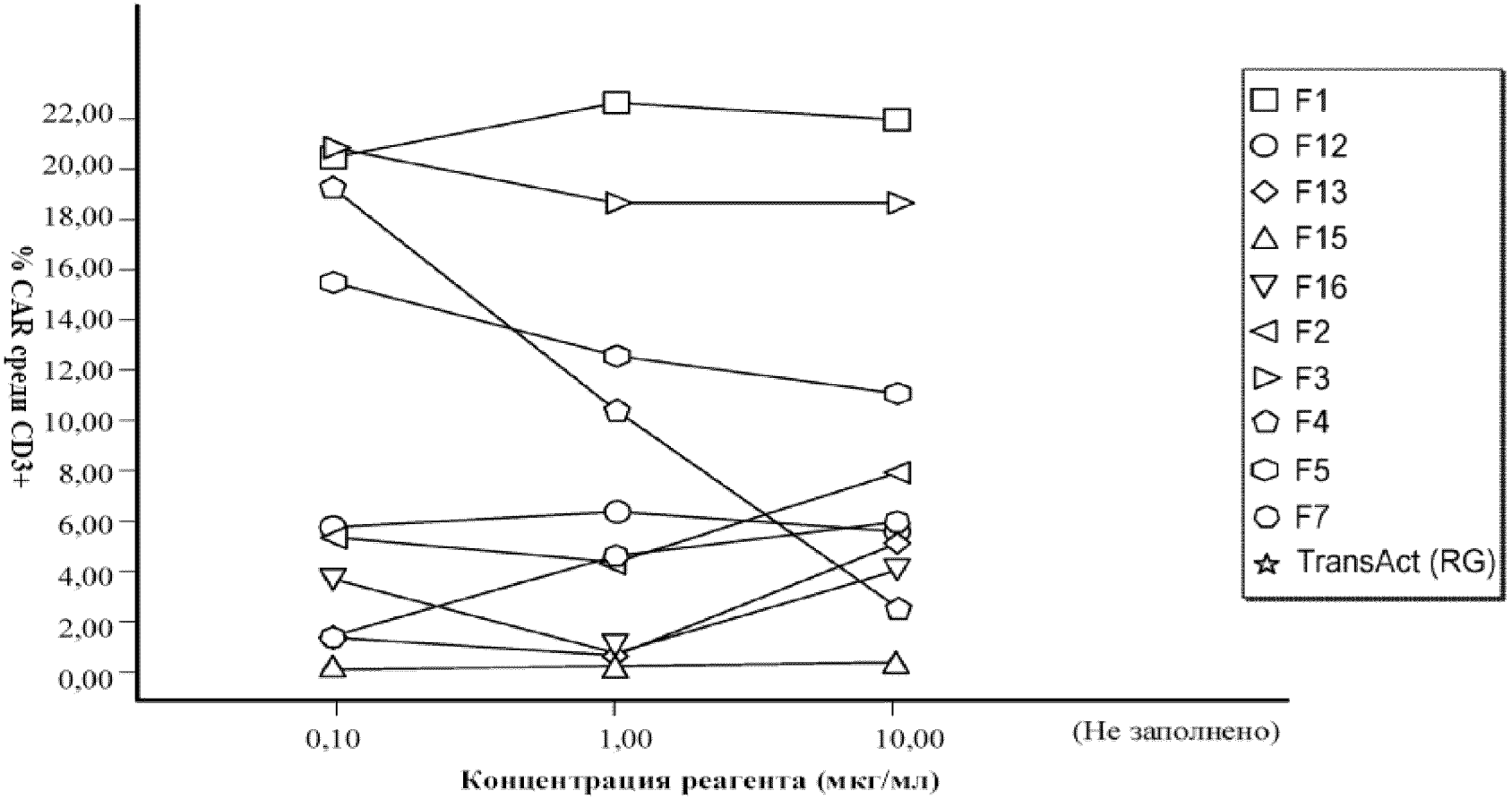
Log концентрации (IFN-γ) (пг/мл)
0
1
2
3
4
1 CD2
2 CD28
3 CD2
4 CD28
5 CD2
6 CD28
7 CD2
8 CD28
9 CD2
10 CD28
12 CD2
13 CD28
14 Отсутствует
15 CD2
16 CD28
17 Отсутствует
TA CD28

ФИГ. 53

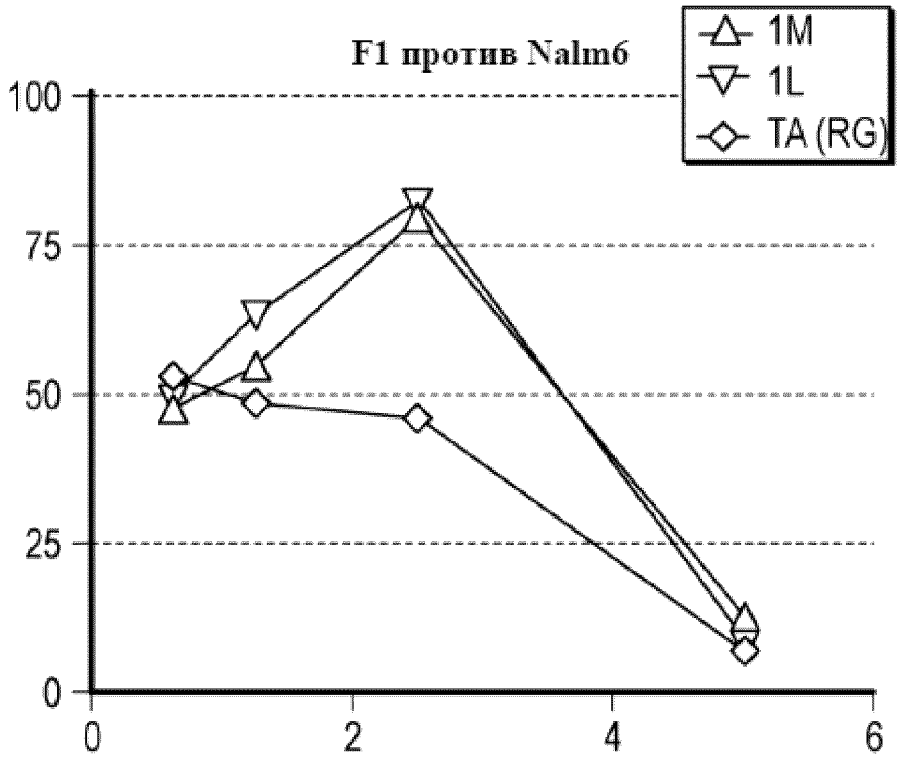
ФИГ. 53
(продолжение)


%CAR19+
0
5
10
15
20
25
30
35
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
12
13
14
15
16
17
TA
CD2
CD28
CD2
CD28
CD2
CD28
CD2
CD28
CD2
CD28
CD2
CD28
Отсутствует
CD2
CD28
Отсутствует
CD28

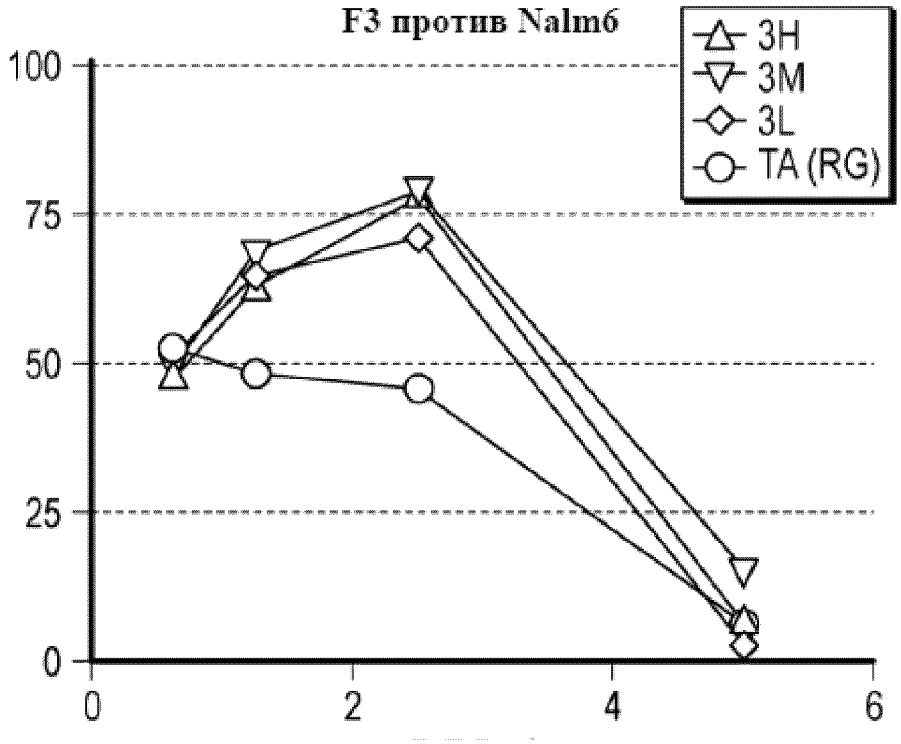
ФИГ. 54


22,00
20,00
18,00
16,00
14,00
12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
2,00
0,00
% CAR среди CD3+
0,10
1,00
10,00
(Не заполнено)
Концентрация реагента (мкг/мл)
F1
F12
F13
F15
F16
F2
F3
F4
F5
F7
TransAct (RG)

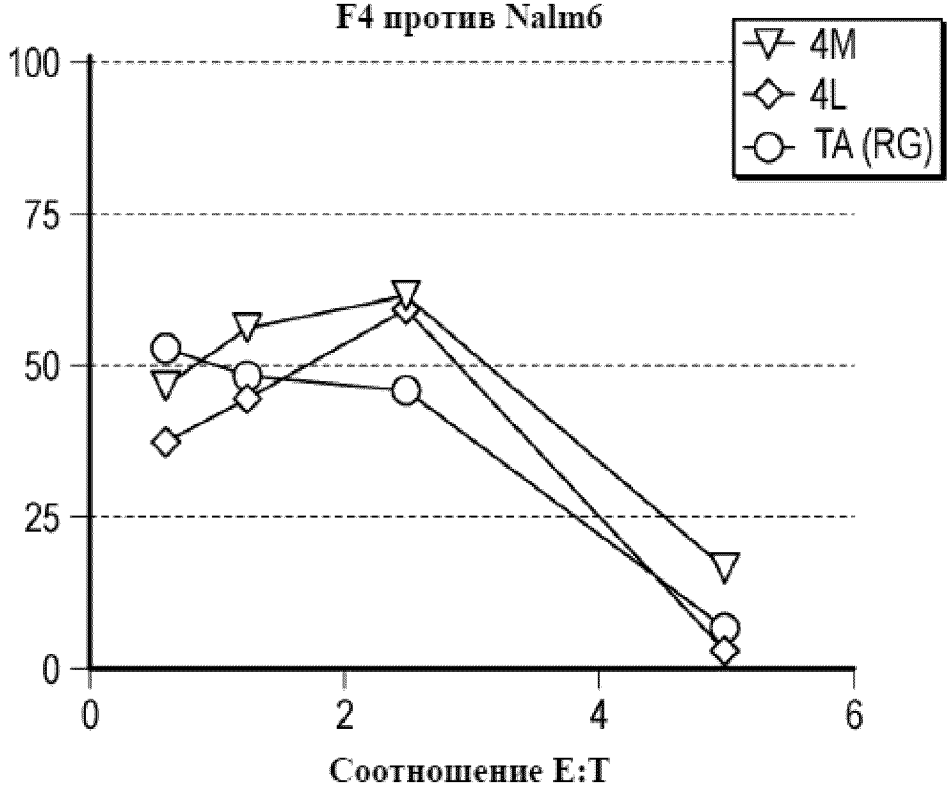
ФИГ. 55



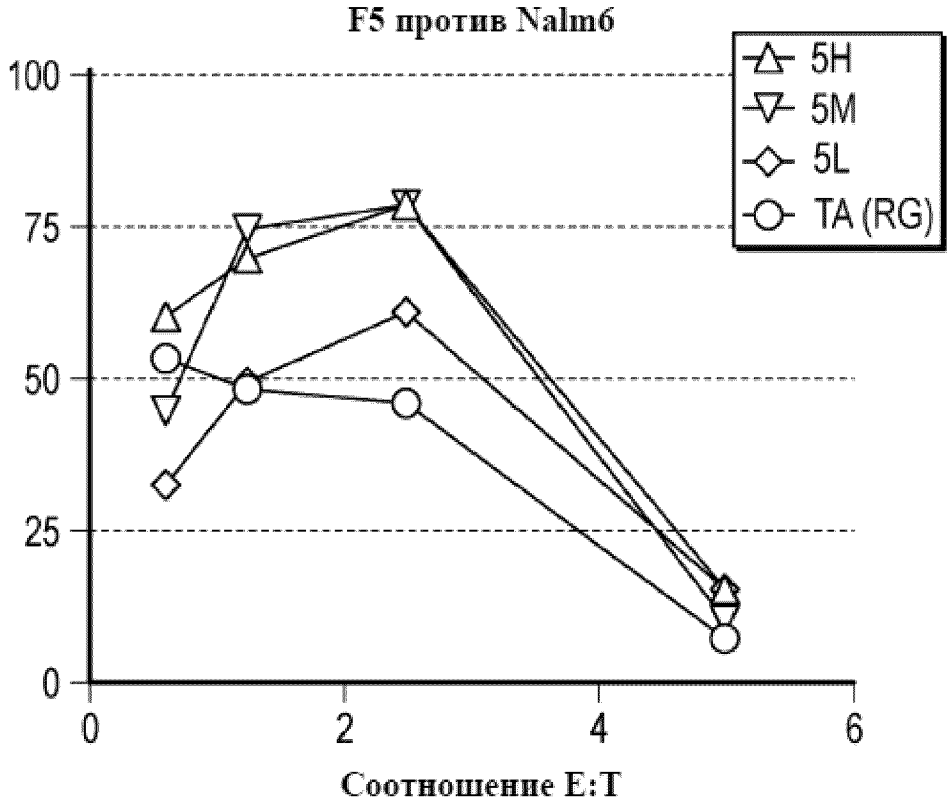
ФИГ. 56A



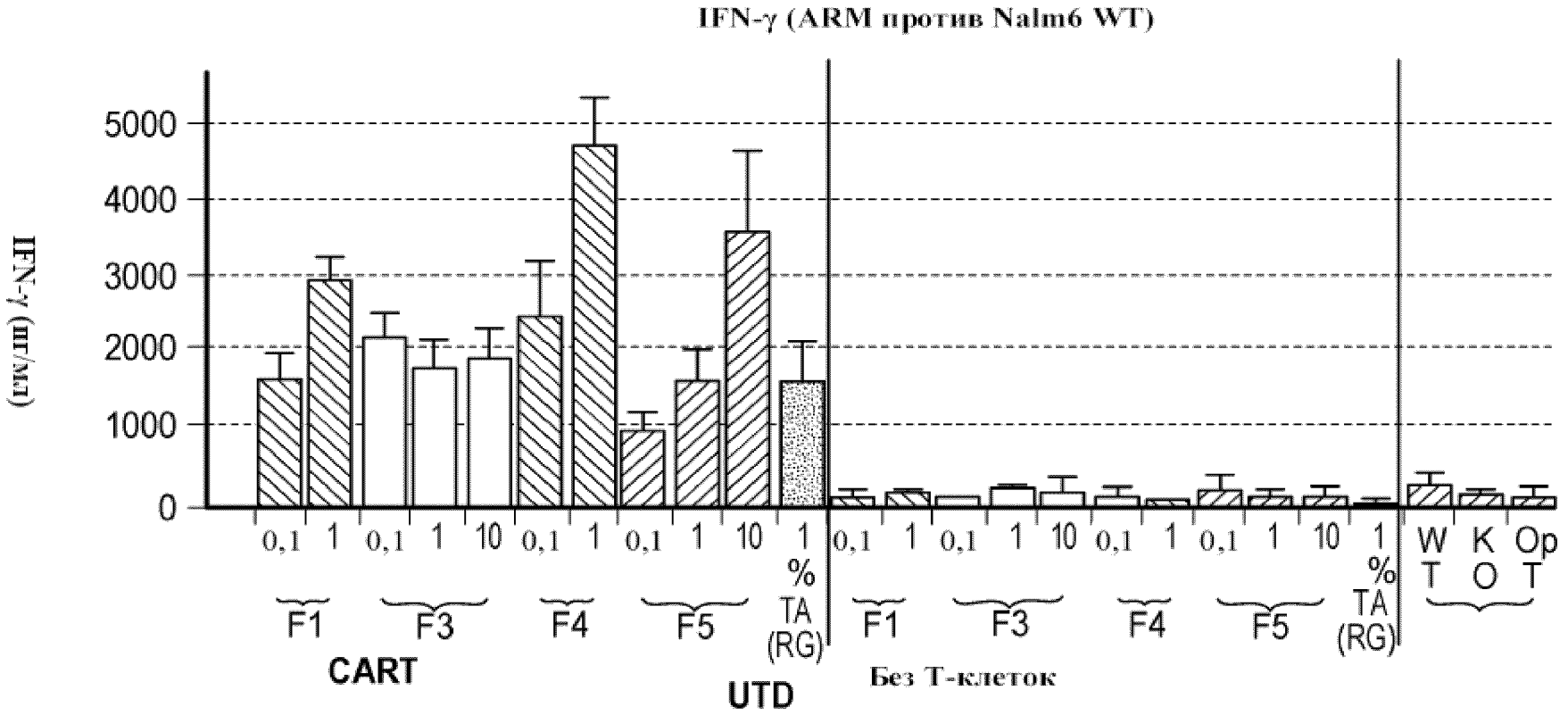
ФИГ. 56B



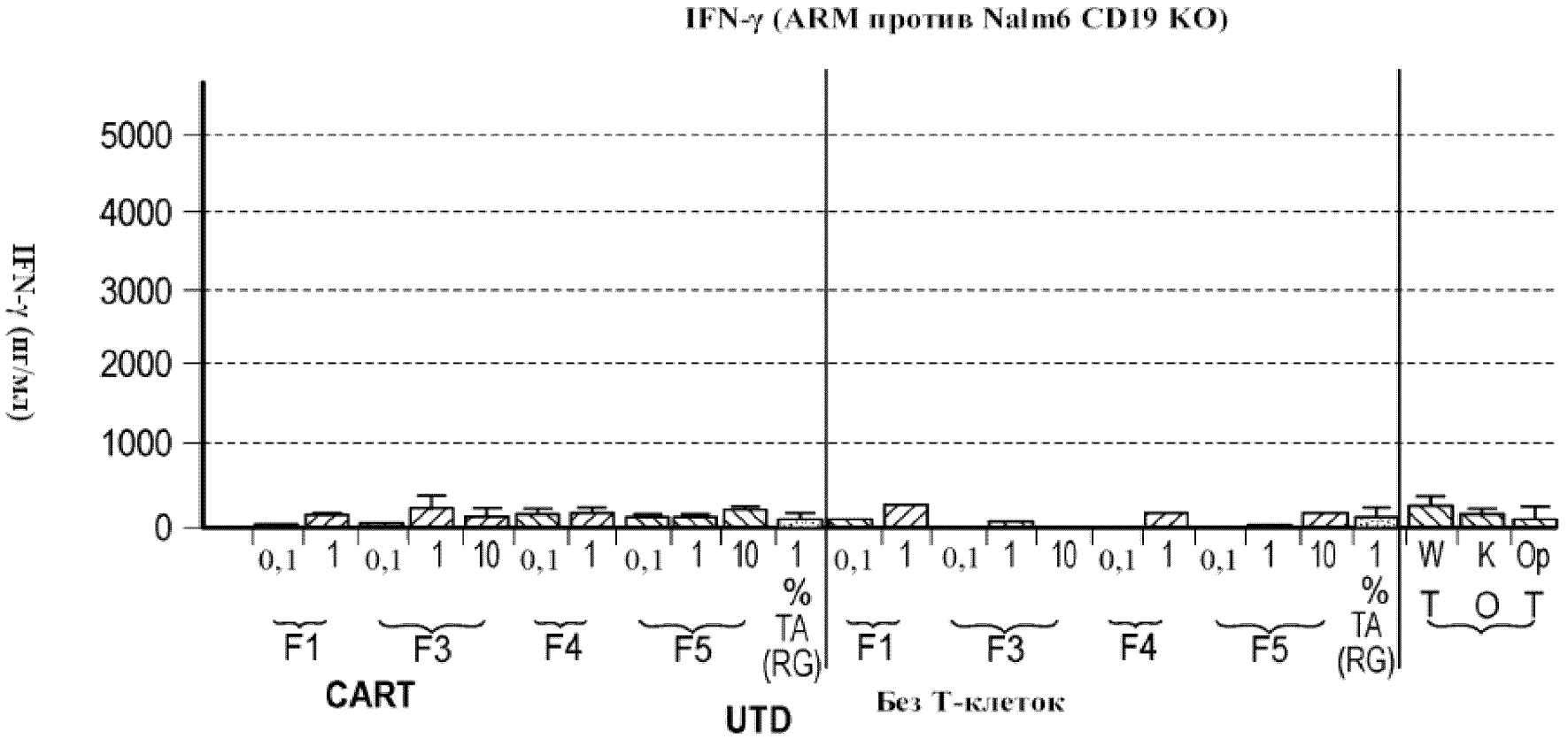
ФИГ. 56C



ФИГ. 56D

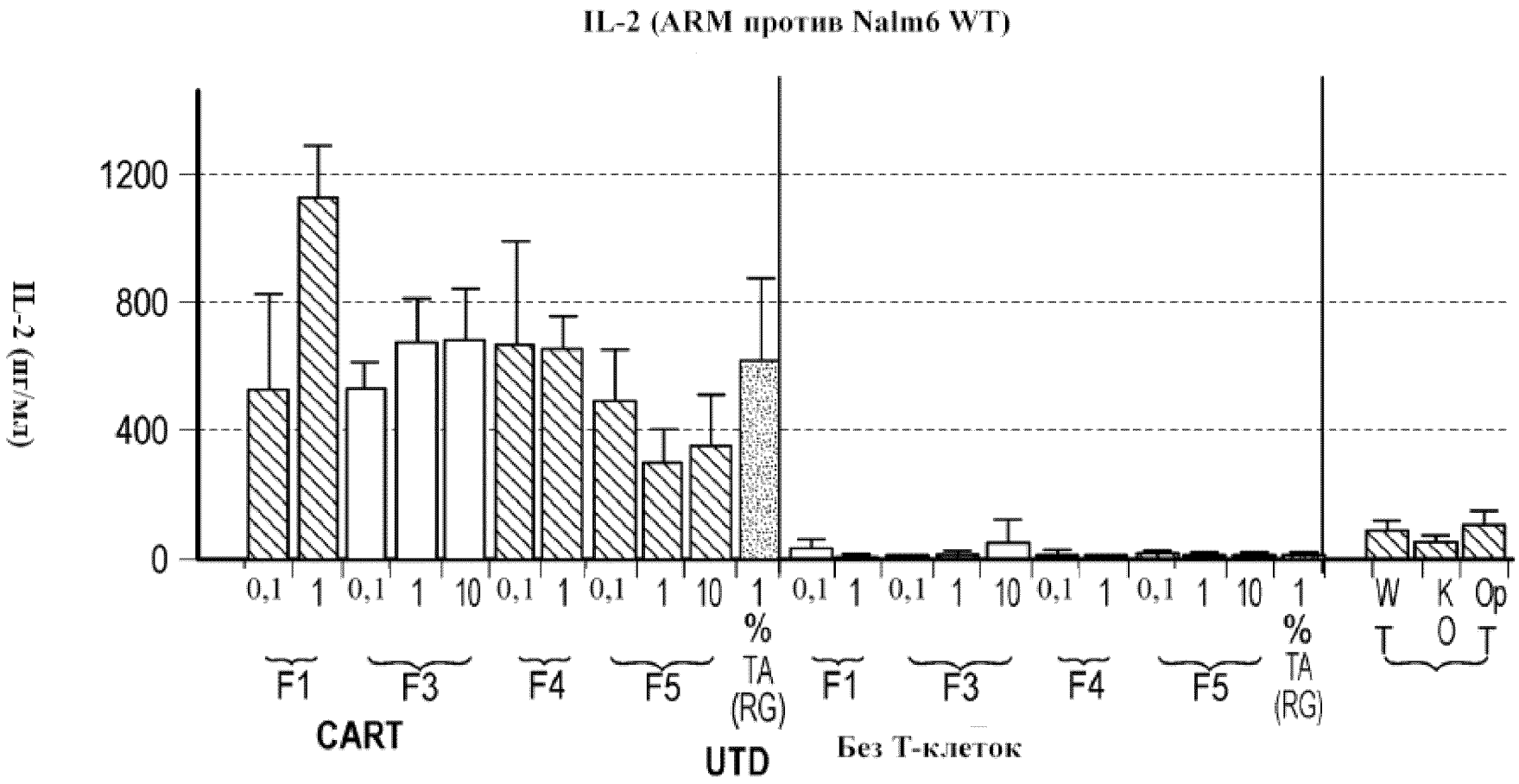

IFN-γ (ARM против Nalm6 WT)
IFN-γ (пг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0,1
1
10
%
TA
(RG)
F1
F3
F4
F5
CART
UTD
Без Т-клеток
W
T
K
O
Op
T

ФИГ. 57A

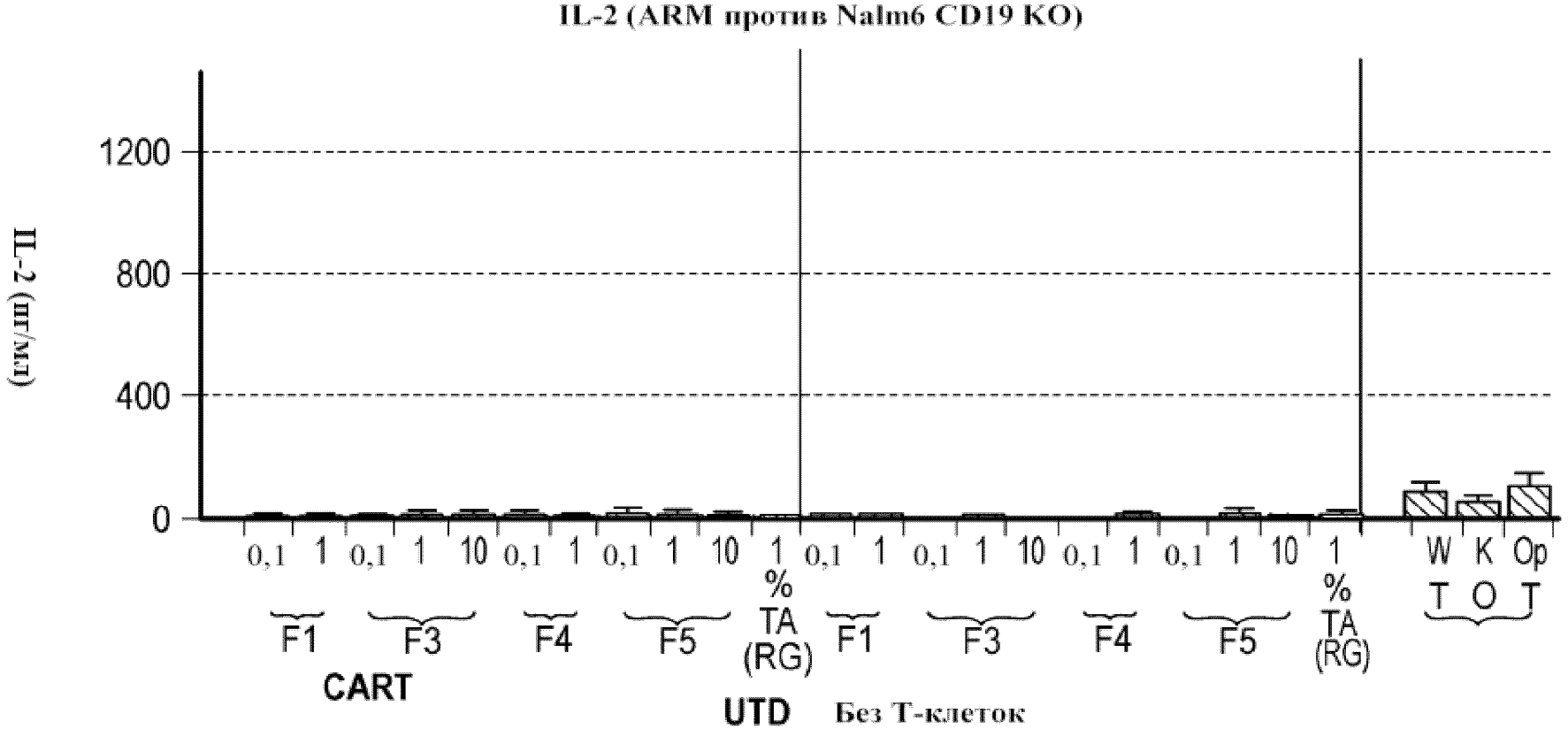


ФИГ. 57A

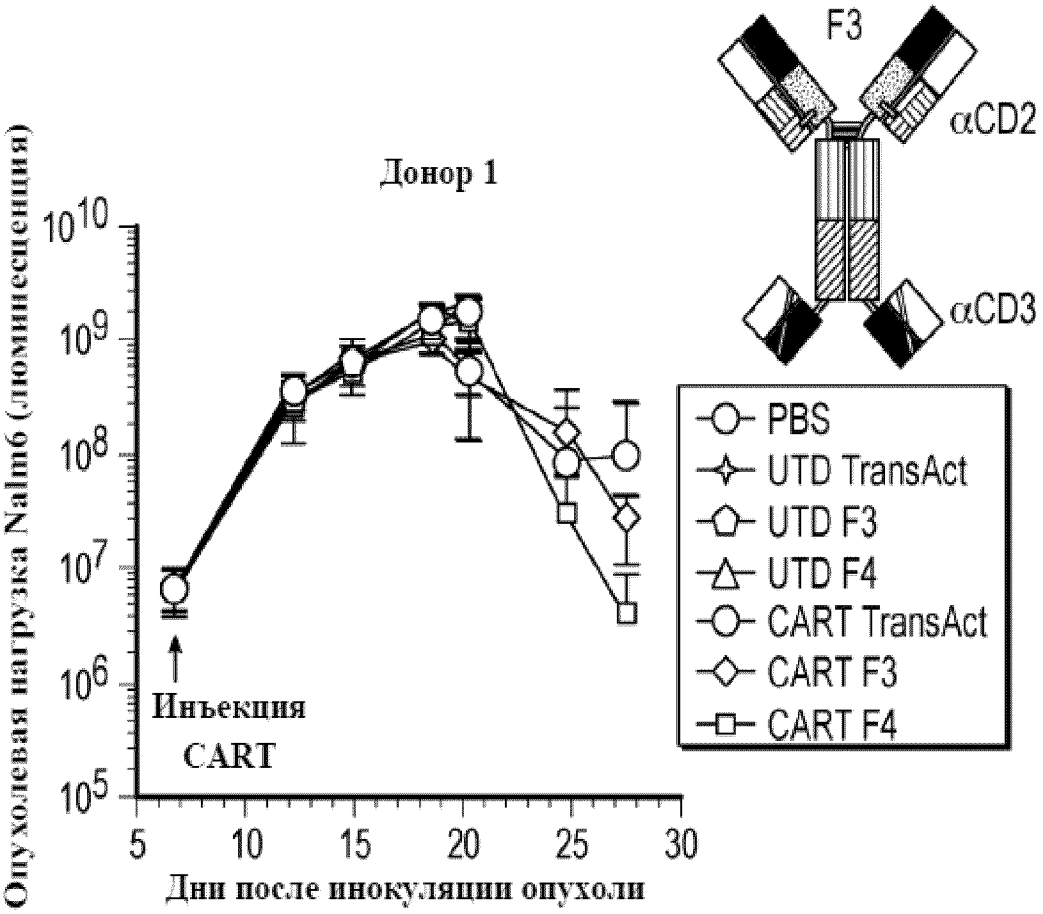
(продолжение)


IL-2 (ARM против Nalm6 WT)
IL-2 (пг/мл)
1200
800
400
0
0,1
1
10
%
TA
(RG)
F1
F3
F4
F5
CART
UTD
Без Т-клеток
W
K
Op
T
O
T

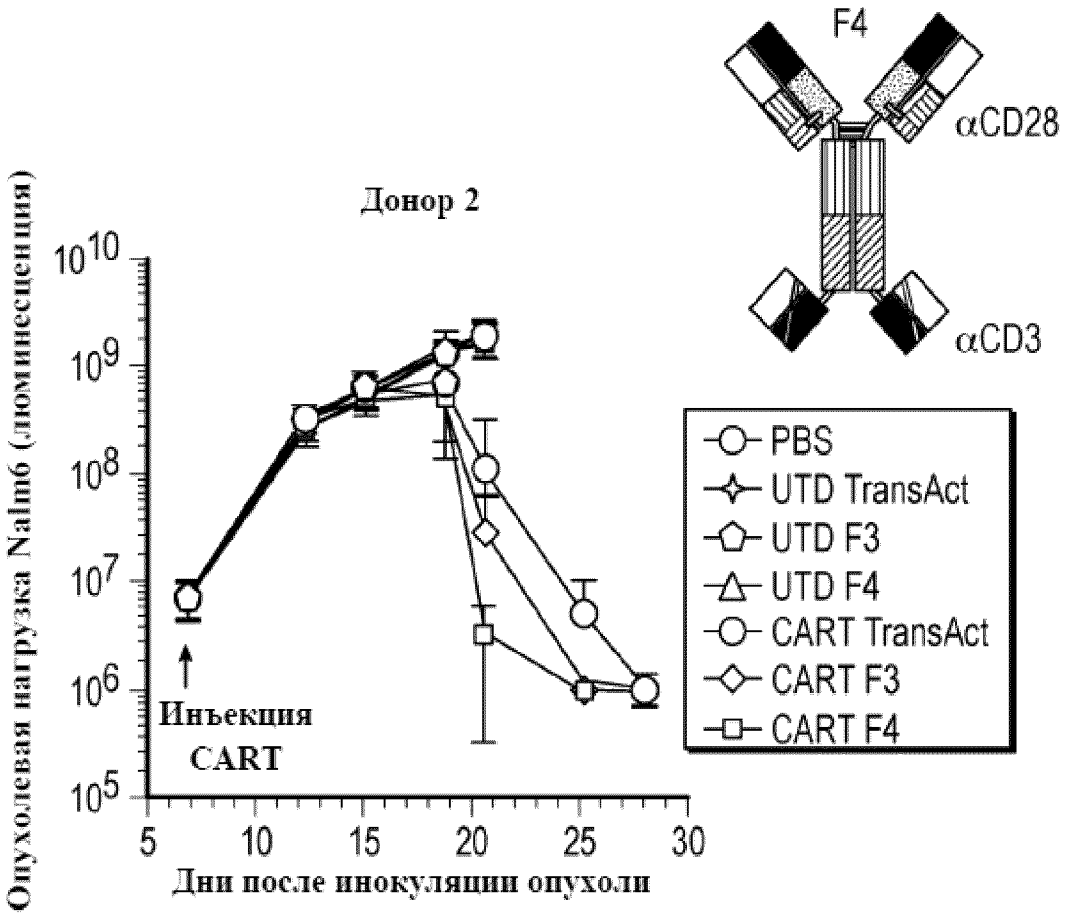
ФИГ. 57B



ФИГ. 57В
(продолжение)

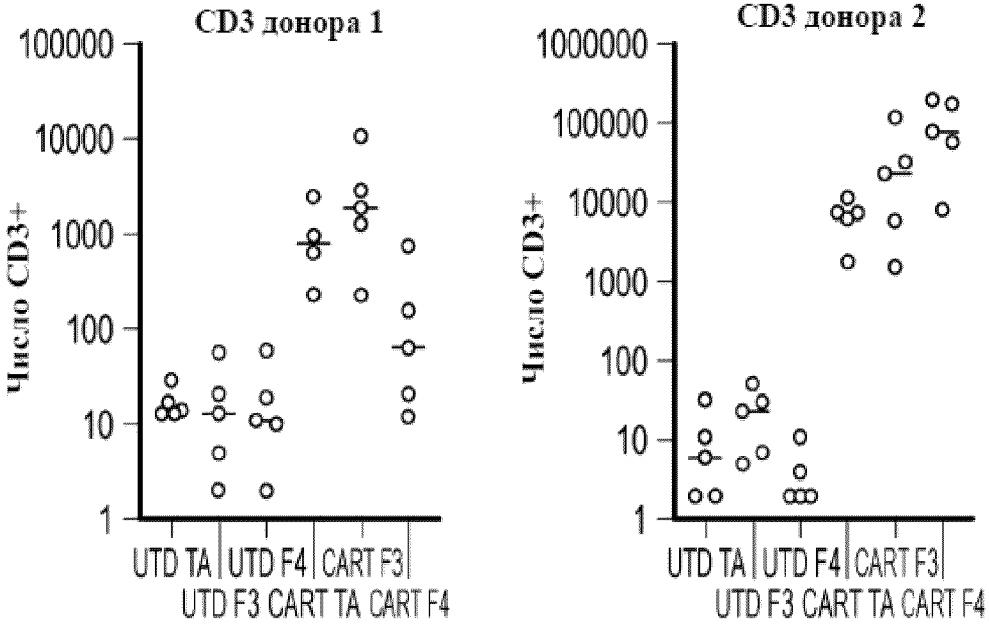

F3
αCD2
αCD3
Донор 1
Опухолевая нагрузка Nalm6 (люминесценция)
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
Инъекция
CART
5
10
15
20
25
30
Дни после инокуляции опухоли
PBS
UTD TransAct
UTD F3
UTD F4
CART TransAct
CART F3
CART F4

ФИГ. 58

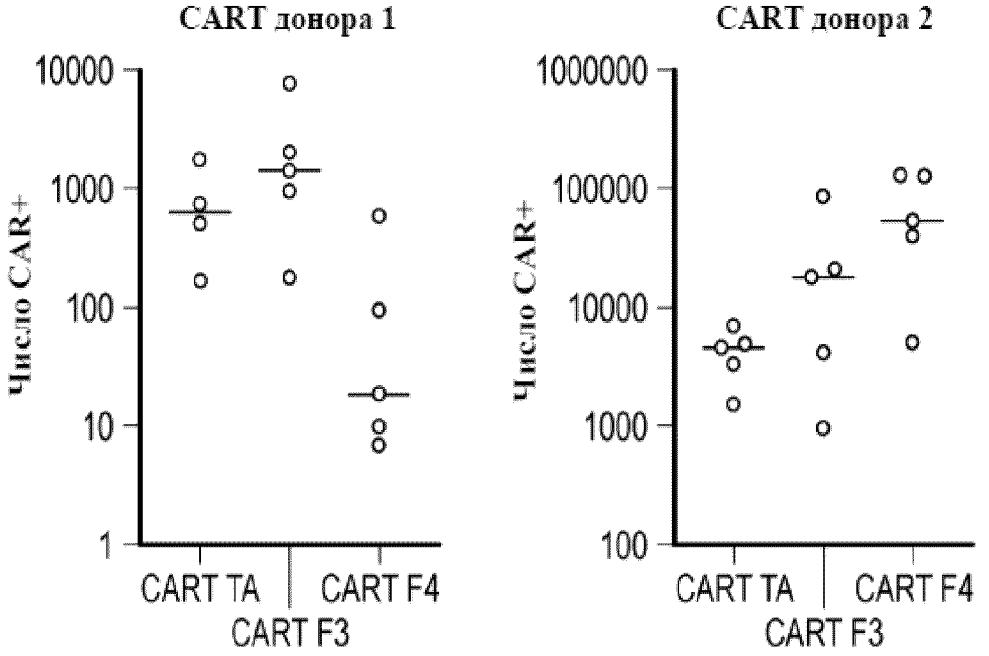


ФИГ. 58
(продолжение)

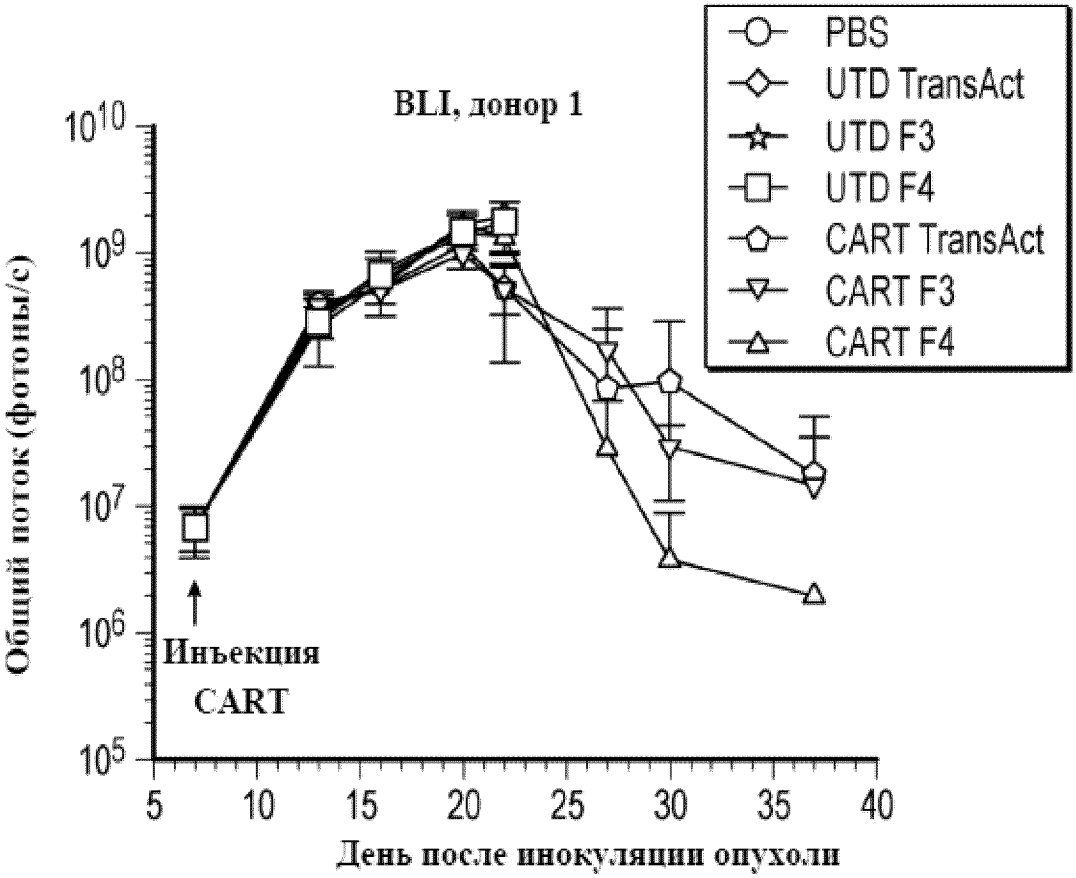
Общая популяция Т-клеток



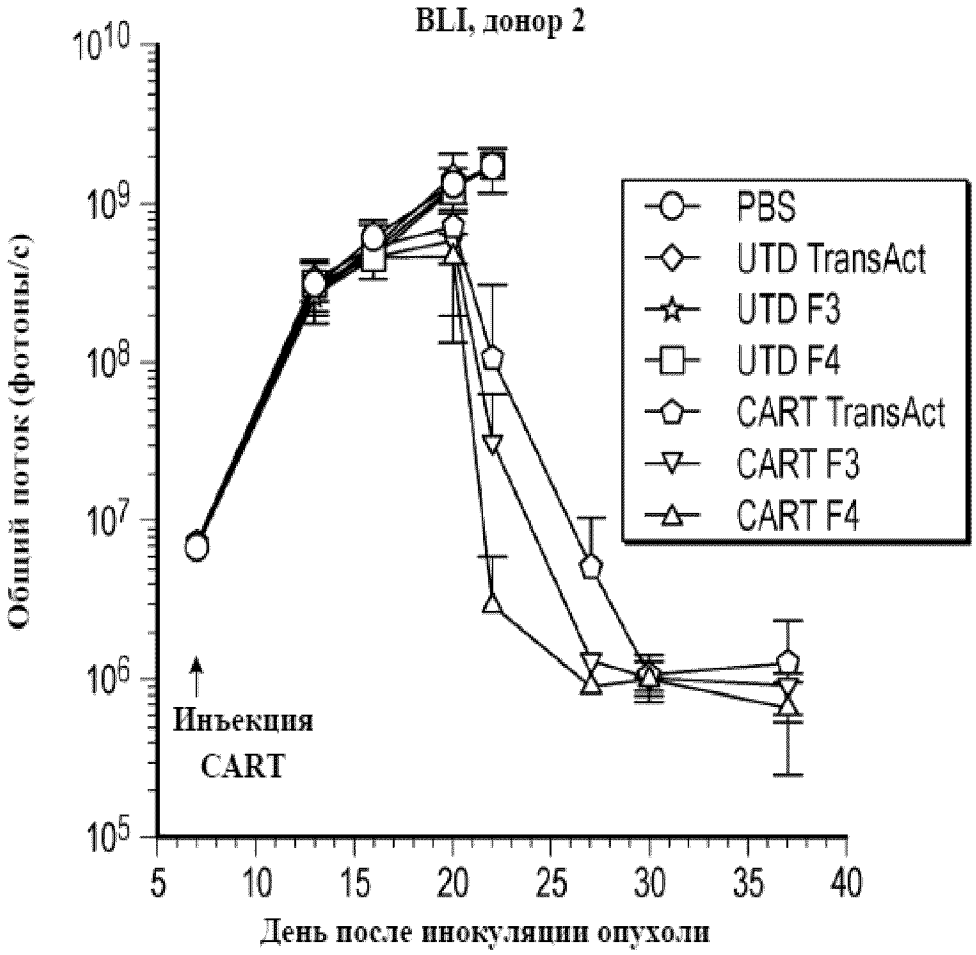
CAR-Т-клетки



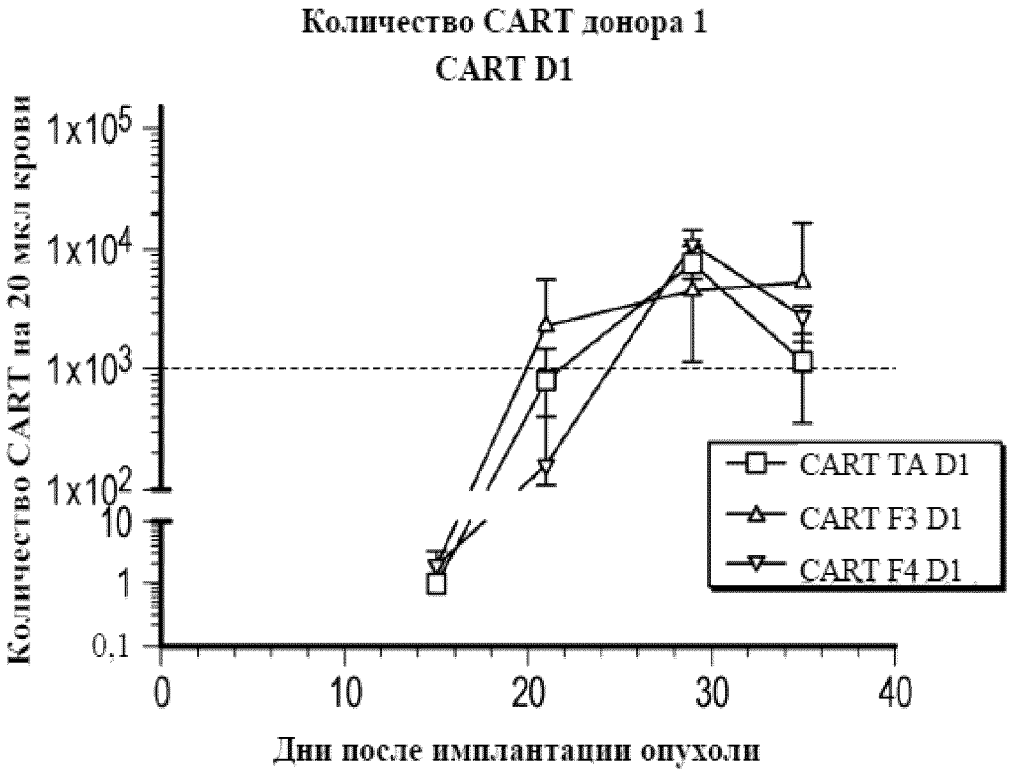
ФИГ. 59


BLI, донор 1
PBS
UTD TransAct
UTD F3
UTD F4
CART TransAct
CART F3
CART F4
Общий поток (фотоны/с)
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
Инъекция
CART
5
10
15
20
25
30
35
40
День после инокуляции опухоли

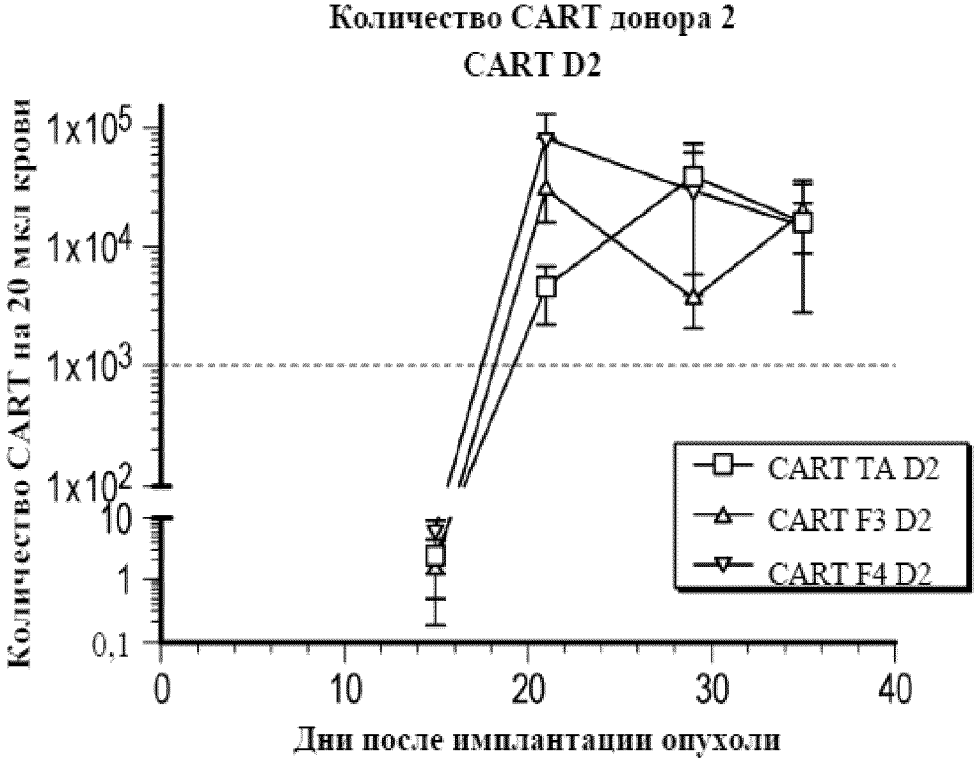
ФИГ. 60А


BLI, донор 2
Общий поток (фотоны/с)
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
PBS
UTD TransAct
UTD F3
UTD F4
CART TransAct
CART F3
CART F4
Инъекция
CART
5
10
15
20
25
30
35
40
День после инокуляции опухоли

ФИГ. 60В



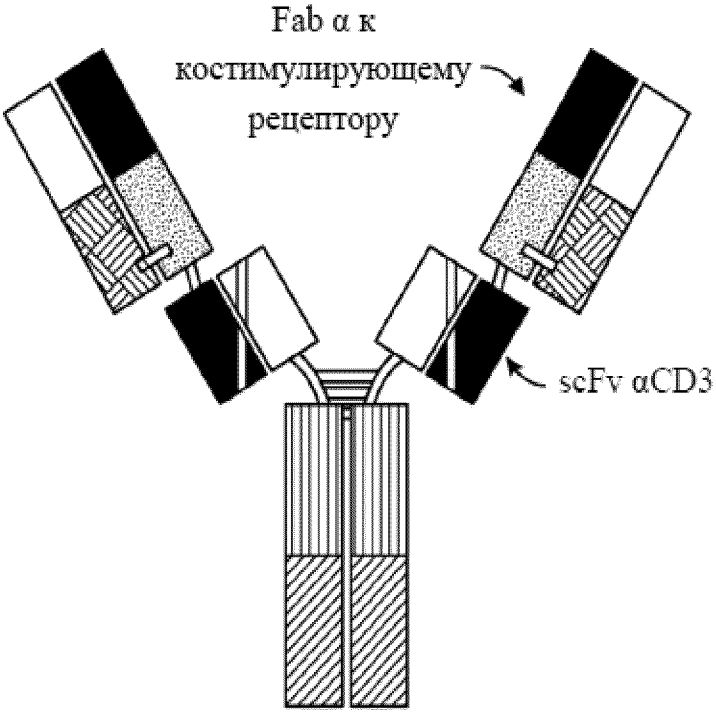
ФИГ. 60C



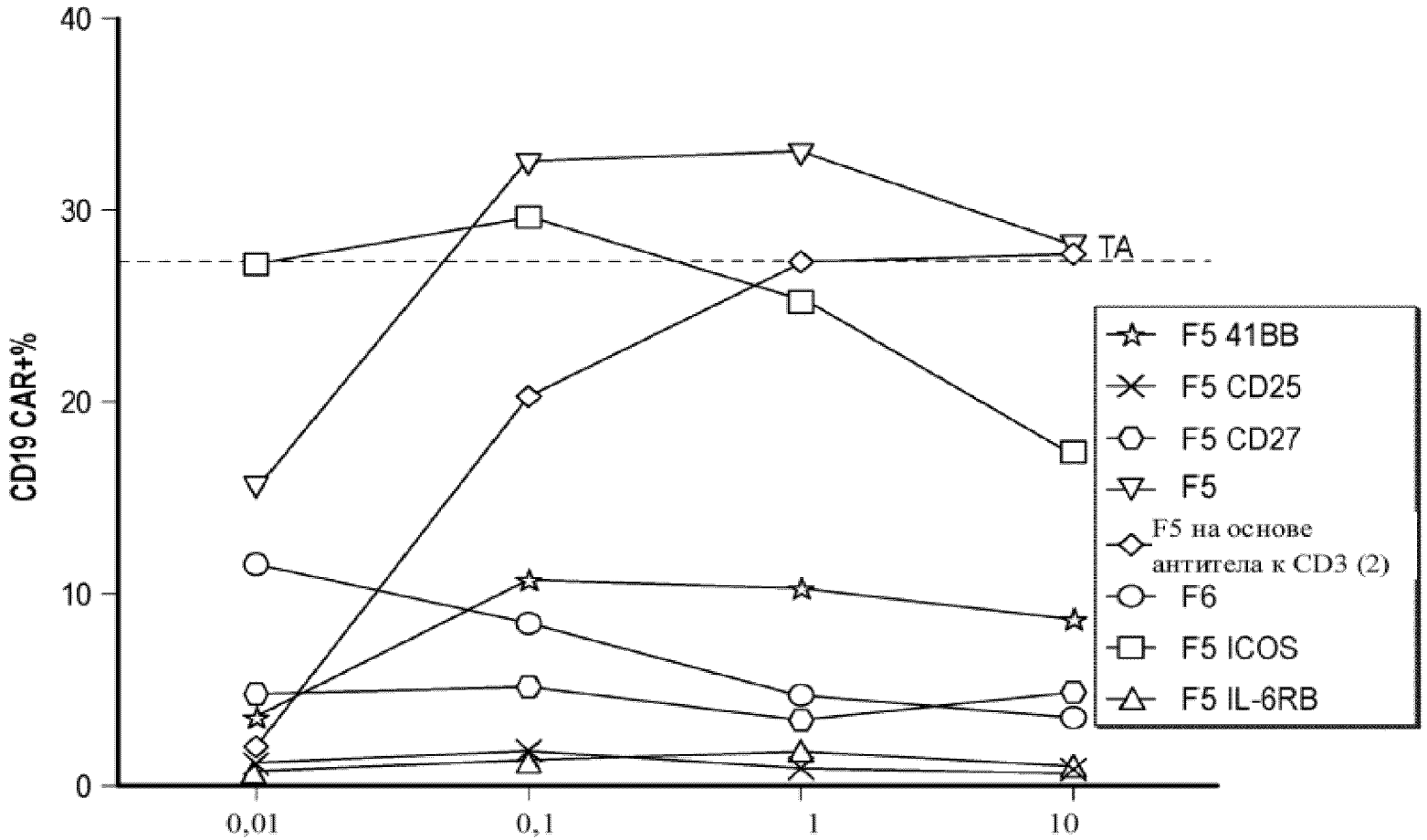
ФИГ. 60D

Костимулирующие связываемые молекулы	CD3-связывающее средство	Название	
CD25	Антитело к CD3 (1)	F5 CD25	Альтернативные костимулирующие молекулы
IL6Rb	Антитело к CD3 (1)	F5 IL6Rb	
CD27	Антитело к CD3 (1)	F5 CD27	
41BB	Антитело к CD3 (1)	F5 41BB	
ICOS	Антитело к CD3 (1)	F5 ICOS	
CD2	Антитело к CD3 (2)	F5 на основе антител к CD3	Альтернативное CD3-связывающее средство

ФИГ. 61A



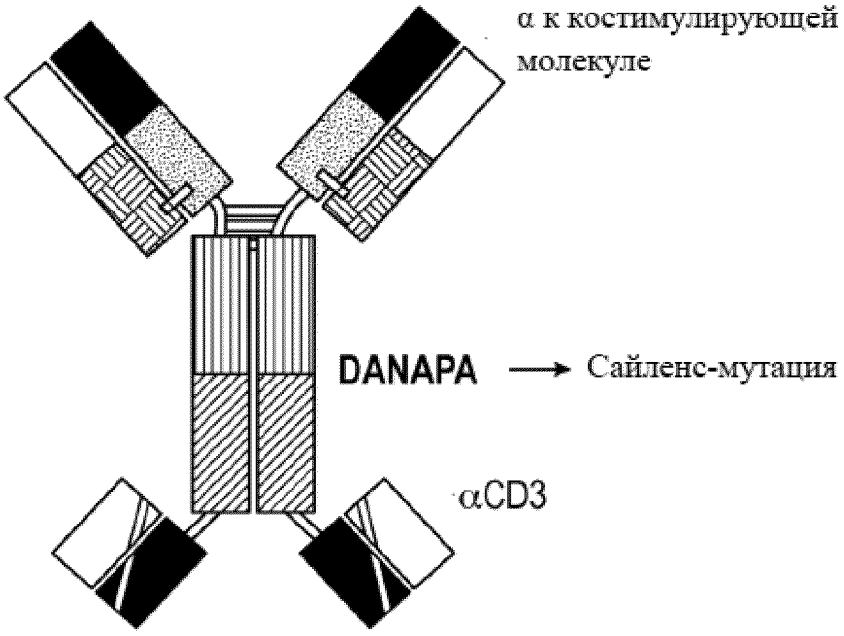
ФИГ. 61B


40
30
20
10
0
CD19 CAR+%
TA
0,01
0,1
1
10
Концентрация (мкг/мл)
F5 41BB
F5 CD25
F5 CD27
F5
F5 на основе антитела к CD3 (2)
F6
F5 ICOS
F5 IL-6RB

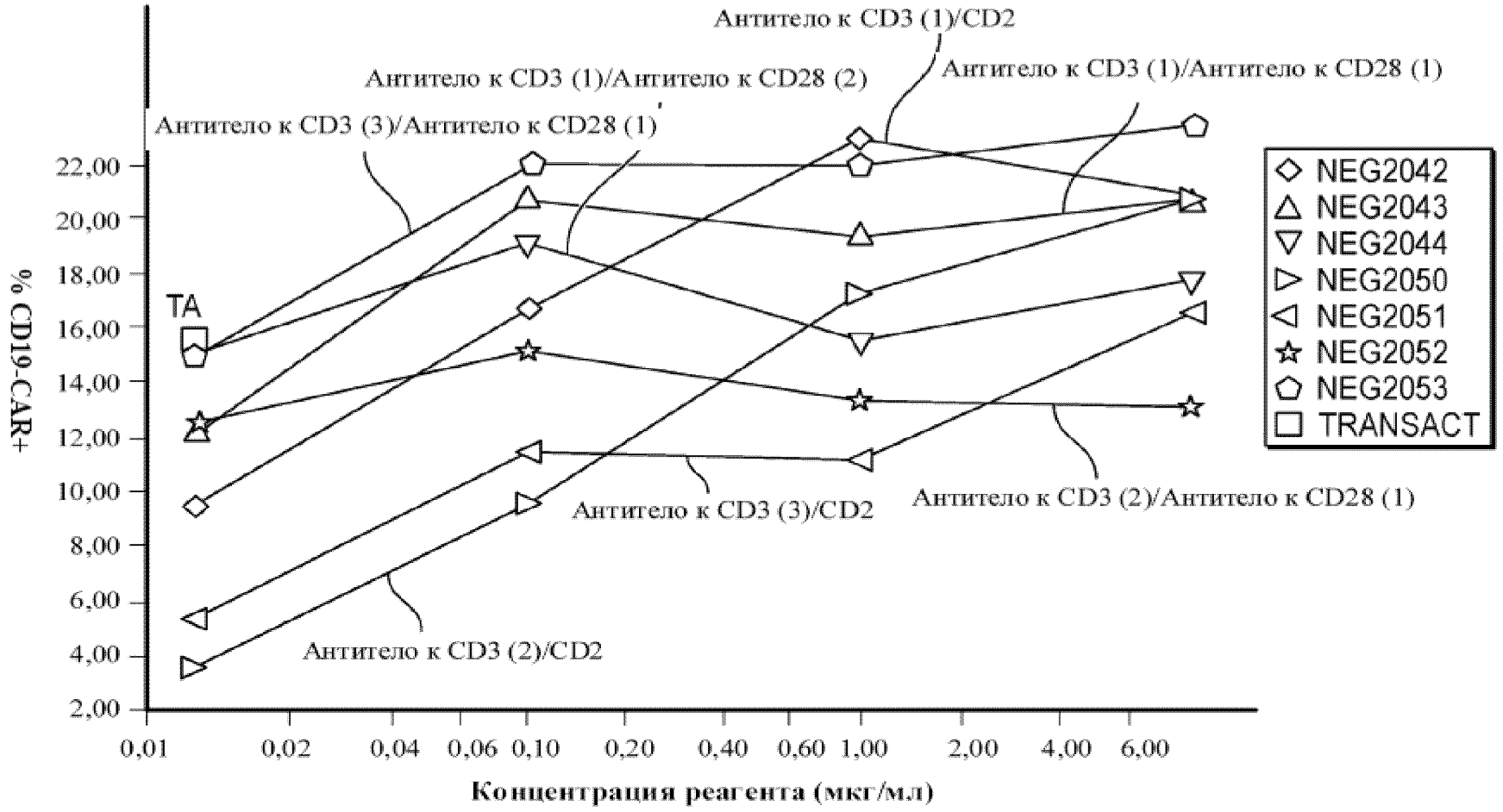
ФИГ. 62

Варианты	Плечо для CD3	Плечо для костимулирующей молекулы	
NEG2042	Антитело к CD3 (1)	CD2	
NEG2043	Антитело к CD3 (1)	Антитело к CD28 (1)	
NEG2044	Антитело к CD3 (1)	Антитело к CD28 (2)	
NEG2050	Антитело к CD3 (2)	CD2	Альтернативные CD3-связывающ средства
NEG2051	Антитело к CD3 (3)	CD2	
NEG2052	Антитело к CD3 (2)	Антитело к CD28 (1)	
NEG2053	Антитело к CD3 (3)	Антитело к CD28 (1)	
F5 без сайленсинга Fc	Антитело к CD3 (1)	CD2	
TransAct		CD28	

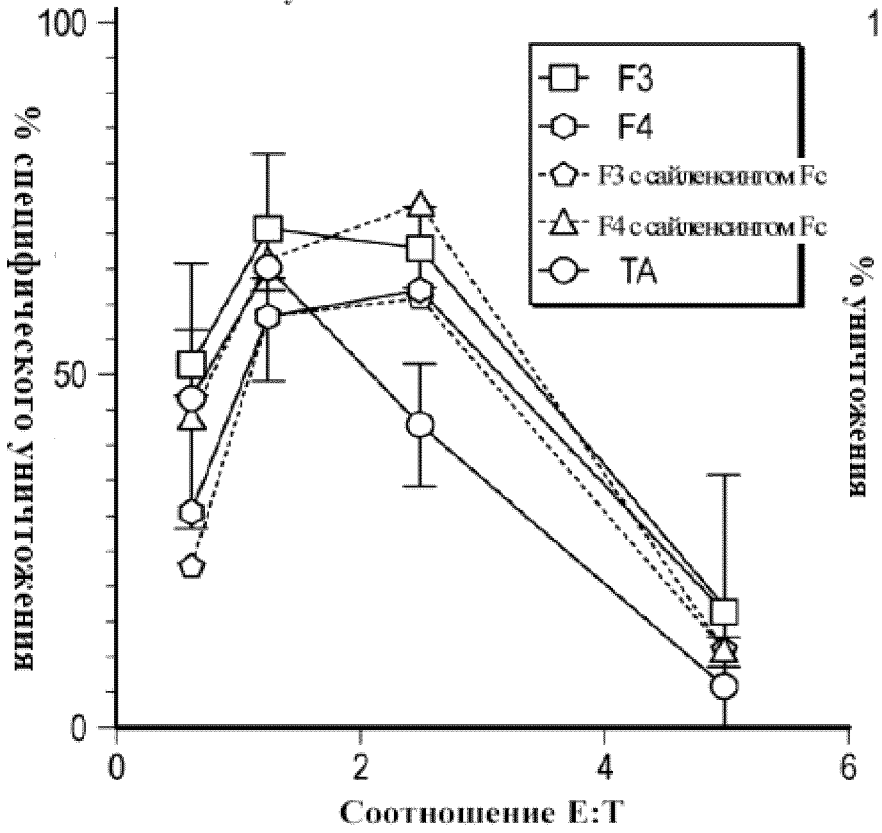
ФИГ. 63А



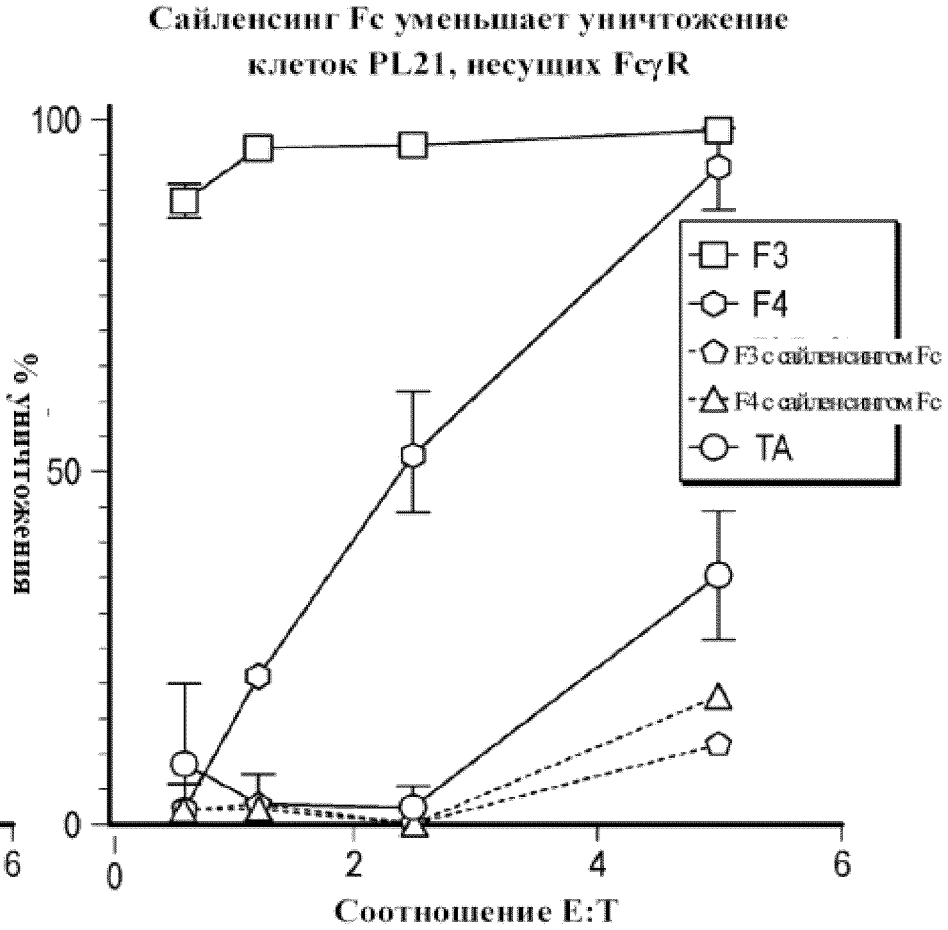
ФИГ. 63В


Антитело к CD3 (1)/CD2
Антитело к CD3 (1)/Антитело к CD28 (2)
Антитело к CD3 (1)/Антитело к CD28 (1)
Антитело к CD3 (3)/Антитело к CD28 (1)
TA
% CD19-CAR+
22,00
20,00
18,00
16,00
14,00
12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
2,00
0,01
0,02
0,04
0,06
0,10
0,20
0,40
0,60
1,00
2,00
4,00
6,00
Концентрация реагента (мкг/мл)
Антитело к CD3 (3)/CD2
Антитело к CD3 (2)/Антитело к CD28 (1)
Антитело к CD3 (2)/CD2
NEG2042
NEG2043
NEG2044
NEG2050
NEG2051
NEG2052
NEG2053
TRANSACT

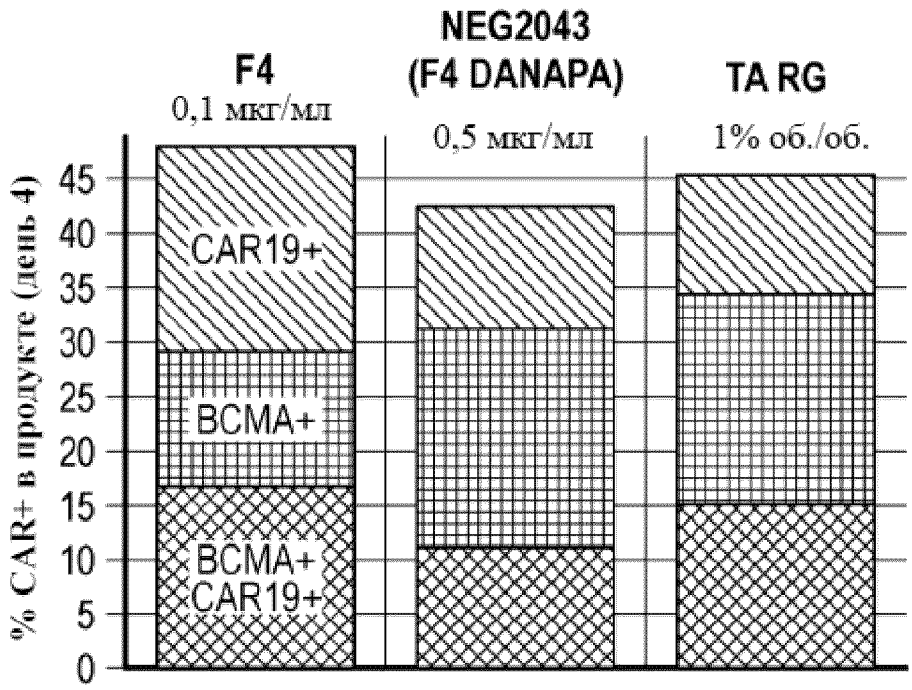
ФИГ. 64



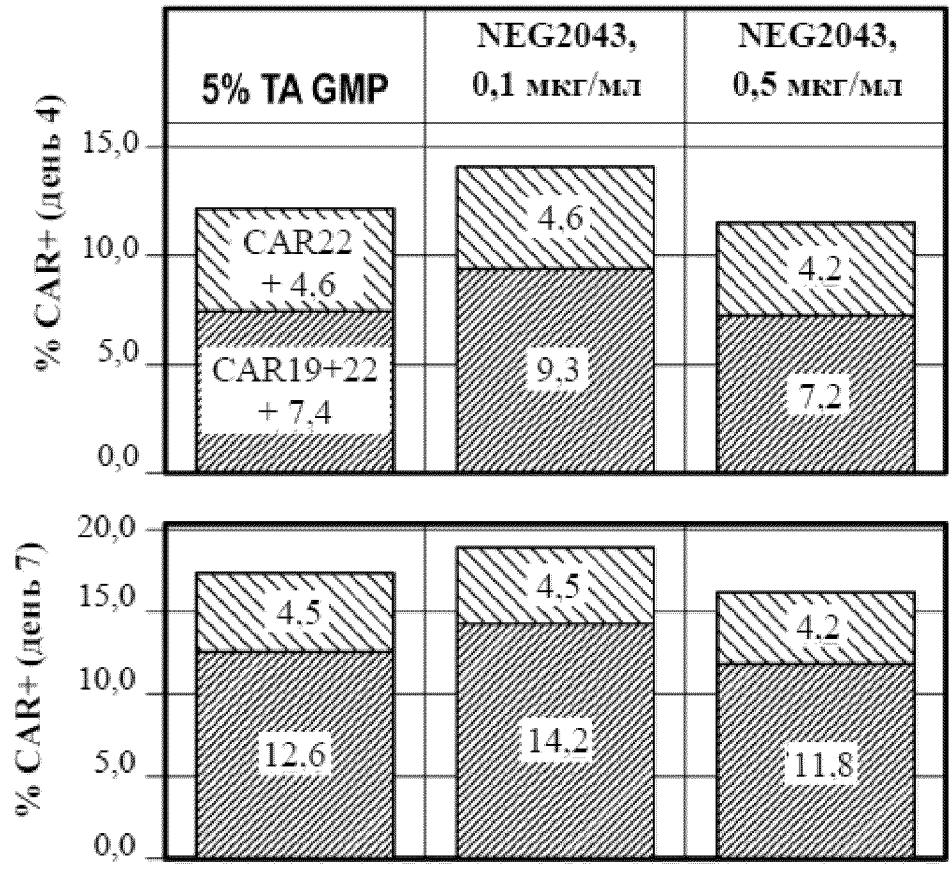
ФИГ. 65A



ФИГ. 65B



ФИГ. 66A



ФИГ. 66B