

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290861 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.15

(22) Дата подачи заявки
2020.09.11

(51) Int. Cl. A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(54) АНТИГЕНУЗНАЮЩИЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА CD371, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/900,141; 62/936,951

(32) 2019.09.13; 2019.11.18

(33) US

(86) PCT/US2020/050386

(87) WO 2021/050862 2021.03.18

(71) Заявитель:

МЕМОРИАЛ СЛОАН-КЕТТЕРИНГ
КЭНСЕР СЕНТЕР; ТРИ-
ИНСТИТЬЮШНЛ ТЕРАПЬЮТИКС
ДИСКАВЕРИ ИНСТИТЬЮТ,
ИНК.; СЛОАН-КЕТТЕРИНГ
ИНСТИТЬЮТ ФОР КЭНСЕР
РИСЕРЧ; МЕМОРИАЛ ХОСПИТАЛ
ФОР КЭНСЕР ЭНД ЭЛЛАЙД
ДИЗИЗЕС (US)

(72) Изобретатель:

Даниян Энтони, Брентдженс Ренье
Дж., Лоренц Иво К., Пол Мэри Энн
(US)

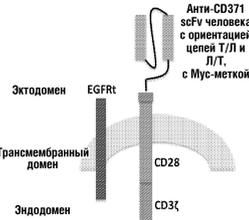
(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к антигенузнающим рецепторам, которые специфически нацелены на CD371, и к клеткам, содержащим такие CD371-нацеленные антигенузнающие рецепторы. Описанное в настоящем описании изобретение также относится к применению CD371-нацеленных антигенузнающих рецепторов для лечения. Описанное в настоящем описании изобретение относится к способам и композициям для иммунотерапии. Изобретение относится к антигенузнающим рецепторам (например, химерным антигенным рецепторам (CAR) или Т-клеточным рецепторам (TCR)), которые специфически нацелены на CD371, к клеткам, содержащим такие рецепторы, а также к способам применения таких клеток для лечения.

CD371-нацеленные CAR на основе фага

E1.B10L3H.MT.I28Z (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным GAS линкером, L3H, и сигнальным доменом на основе CD28Z)
E1.B10L4H.MT.I88Z (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 19-аминокислотным GAS линкером, L4H, и сигнальным доменом на основе 4-1BBZ)
E1.B10L4H.MT.I28Z (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 19-аминокислотным GAS линкером, L4H, и сигнальным доменом на основе CD28Z)
E1.B10H3L.MT.I28Z (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным GAS линкером, H3L, и сигнальным доменом на основе CD28Z)
E1.B10H4L.MT.I28Z (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 19-аминокислотным GAS линкером, H4L, и сигнальным доменом на основе CD28Z)
E1.C3H3L.MT.I28Z (C3, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным GAS линкером, H3L, и сигнальным доменом на основе CD28Z)
E1.C3H4L.MT.I28Z (C3, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным GAS линкером, L4H, и сигнальным доменом на основе CD28Z)
E1.D6L3H.MT.I28Z (D6, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным GAS линкером, L3H, и сигнальным доменом на основе CD28Z)



A1

202290861

202290861

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573661EA/085

АНТИГЕН-УЗНАЮЩИЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА CD371, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США № 62/900141, поданной 13 сентября 2019 г., и временной заявки на патент США № 62/936951, поданной 18 ноября 2019 г., каждая из которых включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан в формате ASCII через EFS-Web и включен в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 11 сентября 2020 г., имеет название 0727341147_ST25 и размер 211921 байт.

1. ВВЕДЕНИЕ

Описанное в настоящем описании изобретение относится к способам и композициям для иммунотерапии. Оно относится к антиген-узнающим рецепторам (например, химерным антигенным рецепторам (CAR) или Т-клеточным рецепторам (TCR)), которые специфически нацелены на CD371, к клеткам, содержащим такие рецепторы, и способам применения таких клеток для лечения.

2. ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Иммунотерапия на основе клеток является терапией для лечения рака с исцеляющим потенциалом. Т-клетки и другие иммунные клетки могут быть модифицированы для нацеливания на опухолевые антигены за счет введения генетического материала, кодирующего искусственные или синтетические рецепторы для антигена, называемые химерными антигенными рецепторами (CAR), специфические для выбранных антигенов. Таргетированная Т-клеточная терапия с использованием CAR недавно продемонстрировала клинический успех в лечении гематологических злокачественных новообразований.

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является наиболее распространенным типом острого лейкоза у взрослых. Он характеризуется накоплением незрелых миелоидных клеток в костном мозге, что приводит к дисфункции кроветворения. Химиотерапия и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) являются стандартными методами лечения ОМЛ. Однако у большинства пациентов в конце концов наступает рецидив и усугубление заболевания.

ОМЛ является наиболее распространенным острым лейкозом у взрослых. Стандартные схемы индукционной химиотерапии не претерпели существенных изменений за последние 40 лет, и общая выживаемость остается очень низкой. Были выявлены часто повторяющиеся аномалии, связанные с генами, кодирующими эпигенетические модификаторы. Разработка CAR-терапии для ОМЛ сдерживается отсутствием подходящих

мишеней. Соответственно, существует потребность в новых терапевтических стратегиях для разработки CAR, нацеленных на антигены, экспрессируемые на высоких уровнях в клетках ОМЛ и ограниченно экспрессируемые в нормальных тканях, для лечения ОМЛ, а также в стратегиях, способных приводить к эффективному уничтожению рака с минимальной токсичностью и иммуногенностью.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Описанное в настоящем описании изобретение относится к антиген-узнающим рецепторам, которые специфически нацелены на CD371, и к клеткам, содержащим такие CD371-нацеленные антиген-узнающие рецепторы. Описанное в настоящем описании изобретение также относится к применению CD371-нацеленных антиген-узнающих рецепторов для лечения.

Описанное в настоящем описании изобретение относится к антиген-узнающему рецептору, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где внеклеточный антигенсвязывающий домен специфически связывает CD371. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой scFv человека. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, который, необязательно, является сшитым. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой F(ab)₂. В конкретных вариантах осуществления один или более из scFv, Fab и F(ab)₂ заключены в слитом белке с гетерологичной последовательностью, с образованием внеклеточного антигенсвязывающего домена.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

(a) CDR1 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, или ее консервативную модификацию; CDR2 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, или ее консервативную модификацию; и CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, или ее консервативную модификацию;

(b) CDR1 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию; CDR2 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию; и CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию;

(c) CDR1 переменной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, или ее консервативную модификацию;

цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57; или

(f) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60; CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61; CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30; CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31; CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%,

приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; и (b) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; и (b) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

(c) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(e) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; или

(f) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. В конкретных вариантах осуществления линкер имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93 или SEQ ID NO: 94. В конкретных вариантах осуществления линкер имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит сигнальный пептид, ковалентно связанный с 5'-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, которые расположены в направлении от N- к C-концу следующим образом: V_H - V_L .

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD371 с низкой аффинностью связывания. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD371 с константой диссоциации (K_d), составляющей 1×10^{-8} М или более.

В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен содержит

полипептид CD28. В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид CD3 ζ . В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен также содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид DAP-10 или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28 или полипептид 4-1BB.

В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), Т-клеточный рецептор (TCR) или подобный Т-клеточному рецептору слитый белок. В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой CAR.

В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор экспрессируется рекомбинантно. В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор экспрессируется с вектора. В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой γ -ретровирусный вектор.

Описанное в настоящем описании изобретение относится к клеткам, содержащим описанный в настоящем описании антиген-узнающий рецептор. В конкретных вариантах осуществления клетка трансдуцирована антиген-узнающим рецептором. В конкретном варианте осуществления антиген-узнающий рецептор конститутивно экспрессируется на поверхности клетки.

В конкретных вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для экспрессии цитокина или его фрагмента. В конкретных вариантах осуществления клетка также содержит экзогенный полипептид цитокина или его фрагмента. В конкретных вариантах осуществления клетка также содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую цитокин или его фрагмент. В конкретных вариантах осуществления цитокин выбран из группы, состоящей из IL-18, IL-33, IL-36, а также их сочетаний. В конкретных вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-18.

В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой иммунореактивную клетку. В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку лимфоидной линии дифференцировки или клетку миелоидной линии дифференцировки. В конкретных вариантах осуществления клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, клетки - естественного киллера (NK) и стволовой клетки, из которой могут дифференцироваться лимфоидные клетки. В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. В конкретных вариантах осуществления Т-клетка представляет собой цитотоксический Т-лимфоцит (CTL) или регуляторную Т-клетку. В конкретных вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку. В конкретных вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку.

Описанное в настоящем описании изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим описанный в настоящем описании антиген-узнающий рецептор. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22. Описанное в настоящем описании изобретение также относится к векторам, содержащим описанные в настоящем описании молекулы нуклеиновой кислоты. В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой γ -ретровирусный вектор.

Кроме того, описанное в настоящем описании изобретение относится к клеткам-хозяевам, экспрессирующим молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.

Описанное в настоящем описании изобретение также относится к композициям, содержащим клетки, описанные в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

Описанное в настоящем описании изобретение также относится к способам уменьшения опухолевого бремени у субъекта. В конкретных вариантах осуществления способ включает введение субъекту эффективного количества описанных в настоящем описании клеток или композиции. В конкретных вариантах осуществления способ приводит к уменьшению количества опухолевых клеток, уменьшению размера опухоли и/или к ликвидации опухоли у субъекта. Описанное в настоящем описании изобретение также относится к способам увеличения или продления срока выживания субъекта, имеющего опухоль или новообразование. В конкретных вариантах осуществления способ включает введение субъекту эффективного количества описанных в настоящем описании клеток или композиции. Описанное в настоящем описании изобретение также относится к способам лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования у субъекта. В конкретных вариантах осуществления способ включает введение субъекту эффективного количества описанных в настоящем описании клеток или композиции. В конкретных вариантах осуществления опухоль или новообразование выбраны из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), глиобластомы, миелодиспластического синдрома (МДС) и хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ). В конкретных вариантах осуществления опухоль или новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

Описанное в настоящем описании изобретение также относится к способам получения описанной в настоящем описании клетки, содержащей CD371-нацеленный

антиген-узнающий рецептор. В конкретных вариантах осуществления способ включает введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген-узнающий рецептор.

Кроме того, описанное в настоящем описании изобретение относится к наборам для уменьшения опухолевого бремени у субъекта, лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования у субъекта, и/или увеличения или продления срока выживания субъекта, имеющего опухоль или новообразование. В конкретных вариантах осуществления набор включает клетку, описанную в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления набор также включает письменные инструкции по использованию клетки для уменьшения опухолевого бремени у субъекта, лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования у субъекта, и/или увеличения или продления срока выживания субъекта, имеющего опухоль или новообразование.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующее далее подробное описание, приведенное в качестве примера, но не предназначенное для ограничения изобретения конкретными описанными вариантами осуществления, может быть лучше понято в сочетании с прилагаемыми чертежами.

На Фигуре 1 представлены структуры антиген-узнающих рецепторов по описанному в настоящем описании изобретению.

На Фигуре 2 показано обнаружение CD371-нацеленного CAR на поверхности трансдуцированных человеческих Т-клеток. Антитела против EGFRt (цетуксимаб-APC) и Мус-метки (9B11-PE) обнаруживали поверхностную экспрессию EGFRt и CAR человека против человеческих мишеней в конструкциях CAR на основе B10. Контроли включали не трансдуцированные человеческие Т-клетки, которые не экспрессировали EGFRt или MYC-метку, а также не содержащие MYC-метку конструкции CAR Etah19h28z (Т-клетки с CAR против CD19 человека) и EtC1HVh28z (Т-клетки с CAR против CD371, полученным из мышиного антитела 107537 против CD371 человека).

На Фигуре 3 показана активность лизиса опухолевых клеток CD371-нацеленными CAR Т-клетками. Покоящиеся в течение 4 дней (4dR) человеческие CD371-нацеленные CAR Т-клетки культивировали совместно с CD33⁺/CD371⁺ клетками U937, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (U937gL), при разных соотношениях эффектор:мишень (Э:М). Биoluminesценцию измеряли через 24 часа и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CAR Т-клеток (на основе B10L4H, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937gL. Et.C1HVh28z представляет собой CD371-нацеленный CAR, полученный из мышиного антитела 1075.7 против CD371 человека, и EtM195MTh28Z представляет собой Т-клеточный CD33-нацеленный CAR, полученный из мышиного анти-CD33 антитела M195 (смотри Zhao *et al.*, *Haematologica* (2010):95:71-78 (2010)).

На Фигуре 4 показана активность лизиса опухолевых клеток CD371-нацеленными CAR Т-клетками в 24-час анализах на уничтожение. Полученные от здорового донора (называемого «донор С») CD371-нацеленные CAR Т-клетки культивировали совместно с

CD33⁺/CD371⁺ клетками U937, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (U937gL), при разных соотношениях эффектор:мишень (Э:М). Биоломинесценцию измеряли через 24 часа и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CAR T-клеток (на основе B10L4H, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937gL. Et.C1HVh28z представляет собой CD371-нацеленный CAR, полученный из мышиного антитела 1075.7 против CD371 человека, и EtM195MTh28Z представляет собой T-клеточный CD33-нацеленный CAR, полученный из мышиного анти-CD33 антитела M195.

На Фигуре 5 показана активность лизиса опухолевых клеток CD371-нацеленными CAR T-клетками в 24-час анализах на уничтожение. Полученные от здорового донора (называемого «донор D») CD371-нацеленные CAR T-клетки культивировали совместно с CD33⁺/CD371⁺ клетками U937, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (U937gL), при разных соотношениях эффектор:мишень (Э:М). Биоломинесценцию измеряли через 24 часа и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CAR T-клеток (на основе B10L4H, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937gL. Et.C1HVh28z представляет собой CD371-нацеленный CAR, полученный из мышиного антитела 1075.7 против CD371 человека, и EtM195MTh28Z представляет собой T-клеточный CD33-нацеленный CAR, полученный из мышиного анти-CD33 антитела M195.

На Фигуре 6 показана активность CD371-нацеленных CAR T-клеток в анализе рекурсивной стимуляции. Полученные от здорового донора (называемого «донор С») CD371-нацеленные CAR T-клетки культивировали совместно с CD33⁺/CD371⁺ клетками U937 при соотношении Э:М, составляющем 1:12,5, и при концентрации 30000 CAR-положительных клеток/мл. CAR T-клетки подсчитывали приблизительно каждые 4-5 дней и характеризовали методом проточной цитометрии, исходное количество опухолевых клеток добавляли обратно в культуру (указано стрелками). Et.B10LHdel представляет собой T-клеточный нефункциональный CAR (лишенный сигнальных доменов); Et.C1HVh28z представляет собой CD371-нацеленный CAR, полученный из мышиного антитела 1075.7 против CD371 человека, и EtM195MTh28Z представляет собой T-клеточный CD33-нацеленный CAR, полученный из мышиного анти-CD33 антитела M195.

На Фигуре 7 показана активность CD371-нацеленных CAR T-клеток в анализе рекурсивной стимуляции. Полученные от здорового донора (называемого «донор D») CD371-нацеленные CAR T-клетки культивировали совместно с CD33⁺/CD371⁺ клетками U937 при соотношении Э:М, составляющем 1:12,5, и при концентрации 30000 CAR-положительных клеток/мл. CAR T-клетки подсчитывали приблизительно каждые 4-5 дней и характеризовали методом проточной цитометрии, исходное количество опухолевых клеток добавляли обратно в культуру (указано стрелками). Et.B10LHdel представляет собой T-клеточный нефункциональный CAR (лишенный сигнальных доменов); Et.C1HVh28z представляет собой CD371-нацеленный CAR, полученный из мышиного антитела 1075.7 против CD371 человека, и EtM195MTh28Z представляет собой T-клеточный CD33-

нацеленный CAR, полученный из мышиноного анти-CD33 антитела M195.

На Фигурах 8А и 8В показана *in vitro* противоопухолевая активность полученных от разных здоровых доноров CD371-нацеленных CAR Т-клеток (второго поколения CAR Т-клеток на основе В10НL и CAR Т-клеток на основе В10LН) в отношении клеток U937gL в 24-час анализе на уничтожение. Полученные от здоровых доноров-людей (называемых «донор А» и «донор В») CD371-нацеленные CAR Т-клетки совместно культивировали с CD371-положительными клетками U937, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (U937gL), при разных соотношениях эффектор:мишень (Э:М). Биolumинесценцию измеряли через 24 часа и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CD371-нацеленных CAR Т-клеток (на основе В10L4Н, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937gL. На Фигуре 8А представлены результаты для донора А. На Фигуре 8В представлены результаты для донора В.

На Фигурах 9А и 9В показана *in vitro* противоопухолевая активность полученных от разных здоровых доноров CD371-нацеленных CAR Т-клеток (второго поколения CAR Т-клеток на основе В10НL и CAR Т-клеток на основе В10LН) в отношении клеток HL60gL в 24-час анализе на уничтожение. Полученные от здоровых доноров-людей (называемых «донор А» и «донор В») CD371-нацеленные CAR Т-клетки совместно культивировали с CD371-положительными клетками HL60, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (HL60gL), при разных соотношениях эффектор:мишень. Биolumинесценцию измеряли через 24 часа и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CD371-нацеленных CAR Т-клеток (на основе В10L4Н, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и HL60gL. На Фигуре 9А представлены результаты для донора А. На Фигуре 9В представлены результаты для донора В.

На Фигурах 10А и 10В показано получение при помощи CRISPR линий клеток с нокаутом CD371 человека (чCD371). Был произведен нокаут CD371 человека в клетках HL60gL (Фиг. 10А) и U937gL (Фиг. 10В) с использованием CRISPR. Нокаут подтверждали методом проточной цитометрии с использованием APC-конъюгированного антитела против CD371 человека. На Фигуре 10А показан нокаут в HL60gL. На Фигуре 10В показан нокаут в U937gL.

На Фигурах 11А и 11В показана цитотоксическая активность полученных от разных здоровых доноров CD371-нацеленных CAR Т-клеток (второго поколения CAR Т-клеток на основе В10, то есть, CAR Т-клеток на основе В10НL и В10LН) в отношении антиген-отрицательных клеток U937gL в 24-час анализе на уничтожение. Полученные от здоровых доноров-людей (называемых «донор А» и «донор В») CD371-нацеленные CAR Т-клетки совместно культивировали с CD371-отрицательными клетками U937, экспрессирующими RFP и люциферазу ципридины (U937RFPсуп.371КО), при разных соотношениях эффектор:мишень. Биolumинесценцию измеряли через 24 часа и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании

нефункциональных CD371-нацеленных CAR T-клеток (на основе B10L4H, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937RFP_{суп}.371KO. На Фигуре 11А представлены результаты для донора А. На Фигуре 11В представлены результаты для донора В.

На Фигурах 12А и 12В показана цитотоксическая активность полученных от разных здоровых доноров CD371-нацеленных CAR T-клеток (второго поколения CAR T-клеток на основе B10, то есть, CAR T-клеток на основе B10HL и B10LH) в отношении антиген-отрицательных клеток HL60gL в 24-час анализе на уничтожение. Полученные от здоровых доноров-людей (называемых «донор А» и «донор В») CD371-нацеленные CAR T-клетки совместно культивировали с CD371-отрицательными клетками HL60, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (HL60L.371KO), при разных соотношениях эффектор:мишень. БиOLUMиНесценцию измеряли через 24 часа и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CD371-нацеленных CAR T-клеток (на основе B10L4H, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и HL60gL.371KO. На Фигуре 12А представлены результаты для донора А. На Фигуре 12В представлены результаты для донора В.

На Фигурах 13А и 13В показана секреция интерферона-гамма (IFN γ) CD371-нацеленными CAR T-клетками (второго поколения CAR T-клетками на основе B10, то есть, CAR T-клетками на основе B10HL и B10LH). Нацеленные на CD371 человека CAR T-клетки культивировали отдельно, а также совместно культивировали с CD371-отрицательными клетками U937 или CD371+ клетками U937 при соотношении эффектор:мишень (Э:М), составляющем 1:1 ($4,0 \times 10^4$: $4,0 \times 10^4$ клеток в 200 мкл). Через 24 часа супернатант собирали и измеряли IFN γ в мультиплексном анализе с гранулами. На Фигуре 13А представлены результаты для донора А. На Фигуре 13В представлены результаты для донора В.

На Фигурах 14А и 14В показана секреция интерлейкина-2 (IL-2) CD371-нацеленными CAR T-клетками (второго поколения CAR T-клетками на основе B10, то есть, CAR T-клетками на основе B10HL и B10LH). Нацеленные на CD371 человека CAR T-клетки культивировали отдельно, а также совместно культивировали с CD371-отрицательными клетками U937 или CD371+ клетками U937 при соотношении эффектор:мишень (Э:М), составляющем 1:1 ($4,0 \times 10^4$: $4,0 \times 10^4$ клеток в 200 мкл). Через 24 часа супернатант собирали и измеряли IL-2 в мультиплексном анализе с гранулами. На Фигуре 14А представлены результаты для донора А. На Фигуре 14В представлены результаты для донора В.

На Фигурах 15А и 15В показана секреция фактора некроза опухолей альфа (TNF α) CD371-нацеленными CAR T-клетками (второго поколения CAR T-клетками на основе B10, то есть, CAR T-клетками на основе B10HL и B10LH). Нацеленные на CD371 человека CAR T-клетки культивировали отдельно, а также совместно культивировали с CD371-отрицательными клетками U937 или CD371+ клетками U937 при соотношении эффектор:мишень (Э:М), составляющем 1:1 ($4,0 \times 10^4$: $4,0 \times 10^4$ клеток в 200 мкл). Через 24

часа супернатант собирали и измеряли TNF α в мультиплексном анализе с гранулами. На Фигуре 15А представлены результаты для донора А. На Фигуре 15В представлены результаты для донора В.

На Фигурах 16А и 16В показана клеточная пролиферация CAR Т-клеток на основе В10 в анализе рекурсивной стимуляции. CD371-нацеленные CAR Т-клетки получали от двух здоровых доноров (донор А и донор В). CAR Т-клетки совместно культивировали с CD371+ клетками U937gL при соотношении Э:М, составляющем 1:5, и при концентрации 50000 CAR-положительных клеток/мл. Приблизительно каждые 5 дней CAR Т-клетки подсчитывали и характеризовали методом проточной цитометрии. Исходное количество опухолевых клеток добавляли обратно в культуру (указано стрелками). На Фигуре 16А представлены результаты для донора А. На Фигуре 16В представлены результаты для донора В.

На Фигуре 17 представлена мышьяная модель ксенотрансплантата ОМЛ. Мышам NCG инокулировали 5×10^4 U937gL клеток ОМЛ линии FAB-M5 через хвостовую вену. Через три дня мышам вводили CD371-нацеленные CAR Т-клетки. Кинетику опухоли определяли неинвазивно с помощью биолуминесцентной визуализации приблизительно каждые 5 дней и контролировали выживаемость.

На Фигуре 18 показана выживаемость мышей с ксенотрансплантатами линейных клеток ОМЛ (донор 1), получавших нацеленные на CD371 человека CAR Т-клетки. Мышам NCG инокулировали 5×10^4 опухолевых клеток U937gL, и через три дня вводили приблизительно $1,25 \times 10^6$ нацеленных на CD371 человека CAR Т-клеток. Выживаемость мышей контролировали.

На Фигуре 19 показана выживаемость мышей с ксенотрансплантатами линейных клеток ОМЛ (донор 2), получавших нацеленные на CD371 человека CAR Т-клетки. Мышам NCG инокулировали опухолевые клетки U937gL, и через три дня вводили приблизительно $1,25 \times 10^6$ нацеленных на CD371 человека CAR Т-клеток. Выживаемость мышей контролировали.

На Фигуре 20 показана *in vivo* активность CAR Т-клеток на основе В10. Мышам NCG инокулировали 5×10^4 опухолевых клеток U937gL, и через три дня вводили CD371-нацеленные CAR Т-клетки в разных дозах ($1,25 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$, $5,0 \times 10^5$ и $1,0 \times 10^6$). Выживаемость мышей контролировали в течение 55 дней (Фигура 20А) и 60 дней (Фигура 20В). На Фигуре 21 показано связывание scFv с клетками НЕК293, экспрессирующими CD371 человека.

На Фигуре 22 показана *in vitro* цитотоксичность CAR Т-клеток второго поколения на основе В10HL в отношении CD371-положительных мишеней. Т-клеточные CAR на основе В10HL имеют G4S линкеры разной длины. Полученные от здоровых людей-доноров (включая доноров А и В) CD371-нацеленные CAR Т-клетки совместно культивировали с антиген-положительными клетками U937, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (U937gL), при разных соотношениях эффектор:мишень. Биолуминесценцию измеряли через 24 часа и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при

совместном культивировании нефункциональных CD371-нацеленных CAR T-клеток (на основе В10L4Н, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937gL.

На Фигуре 23 показана *in vivo* активность CAR T-клеток на основе В10. Мышам NCG инокулировали 5×10^4 опухолевых клеток U937gL и вводили 5×10^5 CAR T-клеток. Выживаемость мышей контролировали. В10Н3L, В10Н5L и IL33-секретирующие нацеленные на CD371 человека В10Н4L CAR T-клетки были более эффективными *in vivo*, чем CAR T-клетки на основе В10Н4L.

На Фигуре 24 показана *in vivo* активность CAR T-клеток на основе В10. Мышам NCG инокулировали 5×10^4 опухолевых клеток U937gL и вводили $2,5 \times 10^5$ CAR T-клеток. Выживаемость мышей контролировали. IL18- и IL33-секретирующие нацеленные на CD371 человека В10Н4L CAR T-клетки были более эффективными *in vivo*, чем CAR T-клетки на основе В10Н4L.

На Фигуре 25 показана *in vivo* активность CAR T-клеток на основе В10. Мышам NCG инокулировали 5×10^4 опухолевых клеток U937gL и вводили $1,0 \times 10^5$ CAR T-клеток. Выживаемость мышей контролировали. В низкой дозе $1,0 \times 10^5$ IL18-секретирующие нацеленные на CD371 человека В10Н4L CAR T-клетки были более эффективными *in vivo*, чем все другие конструкции.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Описанное в настоящем описании изобретение относится к антиген-узнающим рецепторам (например, химерным антигенным рецепторам (CAR) или Т-клеточным рецепторам (TCR)), которые специфически нацелены на CD371. Описанное в настоящем описании изобретение также относится к клеткам, содержащим такие рецепторы. Клетки могут представлять собой иммунореактивные клетки, например, генетически модифицированные иммунореактивные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки). Описанное в настоящем описании изобретение также относится к способам применения таких клеток для лечения, например, для лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования (например, ОМЛ).

Неограничивающие варианты осуществления настоящего изобретения описаны в настоящей спецификации и примерах.

Для ясности изложения, и не в качестве ограничения, подробное описание разделено на следующие подразделы:

- 5.1. Определения;
- 5.2. CD371;
- 5.3. Антиген-узнающие рецепторы;
- 5.4. Клетки;
- 5.5. Композиции и векторы;
- 5.6. Полипептиды;
- 5.7. Препараты и введение;
- 5.8. Способы лечения; и
- 5.9. Наборы

5.1. Определения

Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, должны иметь то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Приведенные ниже ссылки предоставляют специалистам общее определение многих из терминов, используемых по настоящему изобретению: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2-е издание 1994 г.); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5-е издание, R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); и Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). В настоящем описании следующие термины имеют значение, приведенное для них ниже, если нет иных указаний.

Используемый в настоящем описании термин «примерно», или «приблизительно», означает в пределах приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения, при определении специалистом в данной области, что будет частично зависеть от способа измерения или определения значения, то есть, ограничений системы измерений. Например, «приблизительно» может означать «в пределах 3 или более 3 стандартных отклонений» в соответствии с практикой в данной области. Альтернативно, «приблизительно» может означать «в пределах диапазона» до 20%, предпочтительно до 10%, более предпочтительно до 5%, и более предпочтительно до 1%, от конкретного значения. Альтернативно, в частности, применительно к биологическим системам или процессам, термин может означать «в пределах порядка величины», предпочтительно в пределах 5-кратного, и более предпочтительно в пределах 2-кратного значения величины.

Термин «иммунореактивная клетка» означает клетку, которая участвует в иммунном ответе, либо ее предшественника или потомка. В конкретных вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет собой клетку лимфоидной линии дифференцировки. Неограничивающие примеры клеток лимфоидной линии дифференцировки включают Т-клетки, клетки - естественные киллеры (NK), В-клетки и стволовые клетки, из которых могут дифференцироваться лимфоидные клетки. В конкретных вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет собой клетку миелоидной линии дифференцировки.

Выражение «активирует иммунореактивную клетку» означает индукцию сигнальной трансдукции или изменения в экспрессии белка в клетке, приводящие к инициации иммунного ответа. Например, в результате группировки цепей CD3 в ответ на связывание лиганда и иммунорецепторных тирозин-связывающих ингибирующих мотивов (ITAM) возникает каскад сигнальной трансдукции. В конкретных вариантах осуществления, когда эндогенный TCR или экзогенный CAR связывает антиген, происходит образование иммунологического синапса, которое включает группирование многих молекул вблизи связанного рецептора (например, CD4 или CD8, CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ и так далее). Это группирование связанных с мембраной сигнальных молекул допускает фосфорилирование мотивов ITAM, содержащихся в цепях CD3. Это фосфорилирование, в свою очередь, инициирует путь Т-клеточной активации, что в итоге приводит к активации

факторов транскрипции, таких как NF-κB и AP-1. Эти факторы транскрипции индуцируют глобальную экспрессию генов Т-клеток, с увеличением продуцирования ИЛ-2, для пролиферации и экспрессии главных регулирующих Т-клеточных белков, с инициацией опосредованного Т-клетками иммунного ответа.

Выражение «стимулирует иммунореактивную клетку» относится к сигналу, который приводит к сильному и устойчивому иммунному ответу. В различных вариантах осуществления это происходит после того, как иммунная клетка (например, Т-клетка) активируется, или одновременно опосредуется рецепторами, включая, но без ограничения, CD28, CD137 (4-1BB), OX40, CD40 и ICOS. Получение нескольких стимулирующих сигналов может быть важным для создания надежного и долговременного опосредованного Т-клетками иммунного ответа. Т-клетки могут быстро становиться ингибированными и не реагирующими с антигеном. Хотя эффекты этих костимулирующих сигналов могут быть разными, они обычно приводят к увеличению экспрессии генов, с созданием долгоживущих, пролиферирующих и антиапоптотических Т-клеток, которые надежно реагируют на антиген для полного и устойчивого его устранения.

Используемый в настоящем описании термин «антиген-узнающий рецептор» относится к рецептору, который способен узнавать целевой антиген (например, CD371). В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор способен активировать иммунную или иммунореактивную клетку (например, Т-клетку) при ее связывании с целевым антигеном.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» означает не только интактные молекулы антител, но также и фрагменты молекул антител, которые сохраняют способность к связыванию иммуногена. Такие фрагменты также хорошо известны в данной области, и их регулярно используют как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно, используемый в настоящем описании термин «антитело» означает не только интактные молекулы иммуноглобулина, но также и хорошо известные активные фрагменты F(ab')₂ и Fab. Фрагменты F(ab')₂ и Fab, лишенные Fc-фрагмента интактного антитела, быстрее выводятся из циркуляции, и могут иметь меньшую степень неспецифического связывания с тканями, чем интактное антитело (Wahl *et al.*, *Nucl Med* (1983);24:316-325). Используемый в настоящем описании термин охватывает целые нативные антитела, биспецифические антитела; химерные антитела; Fab, Fab', одноцепочечные фрагменты V-области (scFv), слитые полипептиды и необычные антитела. В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (в настоящем описании сокращенно называемой V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (в настоящем описании сокращенно называемой V_L) и константной области легкой цепи C_L. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены

на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые перемежаются более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех областей CDR и четырех областей FR, расположенных от amino-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Используемый в настоящем описании термин «области CDR» относится к аминокислотным последовательностям определяющей комплементарность области антитела, которые представляют собой гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. См. например, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987), или систему нумерации IMGT (Lefranc, *The Immunologist* (1999);7:132-136; Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* (2003);27:55-77). Как правило, антитела содержат три области CDR тяжелой цепи и три области CDR легкой цепи в вариабельной области. Области CDR обеспечивают большинство контактных остатков для связывания антитела с антигеном или эпитопом. В конкретных вариантах осуществления границы областей CDR определяют с использованием системы нумерации IMGT. В конкретных вариантах осуществления области CDR определяют с использованием системы нумерации IMGT, доступной по сетевому адресу http://www.imgt.org/IMGT_vquest/input.

Используемый в настоящем описании термин «одноцепочечный вариабельный фрагмент», или «scFv», означает слитый белок из вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулина (например, мышинового или человеческого), ковалентно связанных, с образованием гетеродимера $V_H::V_L$. Вариабельные области тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей либо связаны непосредственно, либо связаны пептидным линкером (например, из 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец V_H с C-концом V_L , или C-конец V_H с N-концом V_L . Линкер, как правило, богат остатками глицина для гибкости, а также остатками серина или треонина для растворимости. Линкер может связывать вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров описаны в публикациях Shen *et al.*, *Anal. Chem.* 80(6):1910-1917 (2008) и WO 2014/087010, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. В конкретных вариантах осуществления линкер представляет собой G4S линкер.

В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, которая представлена ниже:

GGGGSGGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 13]

В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, которая представлена ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS [SEQ ID NO: 14]

В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91, которая представлена ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS [SEQ ID NO: 91]

В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92, которая представлена ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS [SEQ ID NO: 92]

В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, которая представлена ниже:

GGGGS [SEQ ID NO: 93]

В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94, которая представлена ниже:

GGGGS GGGGS [SEQ ID NO: 94]

Несмотря на удаление константных областей и введение линкера, белки scFv сохраняют специфичность исходного иммуноглобулина. Антитела в виде одноцепочечного полипептида Fv могут экспрессироваться с нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующие V_H и V_L последовательности, как описано в публикации Huston, *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1988);85:5879-5883; патентах США №№ 5091513, 5132405 и 4956778; и публикациях патентов США №№ 20050196754 и 20050196754. Описаны антагонистические scFv, обладающие ингибирующей активностью (смотри, например, Zhao *et al.*, *Hybridoma (Larchmt)* (2008);27(6):455-51; Peter *et al.*, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2012);August 12; Shieh *et al.*, *J Immunol* (2009);183(4):2277-85; Giomarelli *et al.*, *Thromb Haemost* (2007);97(6):955-63; Fife *et al.*, *J Clin Invest* (2006);116(8):2252-61; Brocks *et al.*, *Immunotechnology* 1997 3(3):173-84; Moosmayer *et al.*, *Ther Immunol* 1995 2(10):31-40). Описаны агонистические scFv, обладающие стимулирующей активностью (Peter *et al.*, *J Biol Chem* (2003);25278(38):36740-7; Xie *et al.*, *Nat Biotech* 1997 15(8):768-71; Ledbetter *et al.*, *Crit Rev Immunol* (1997);17(5-6):427-55; Ho *et al.*, *Biochim Biophys Acta* (2003);1638(3):257-66).

Используемый в настоящем описании термин «химерный антигенный рецептор», или «CAR», относится к молекуле, содержащей внеклеточный антигенсвязывающий домен, слитый с внутриклеточным сигнальным доменом, который способен активировать или стимулировать иммунореактивную клетку, и трансмембранным доменом. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR содержит scFv. scFv может быть получен в результате слияния переменных областей тяжелой и легкой областей антитела. Альтернативно или дополнительно, scFv могут быть получены из Fab (вместо антитела, например, получены из библиотек Fab). В конкретных вариантах осуществления scFv слит с трансмембранным доменом, а затем с внутриклеточным сигнальным доменом. Термин «по существу идентичные», или «по существу гомологичные», относится к полипептиду или молекуле нуклеиновой кислоты, которые

являются по меньшей мере приблизительно на 50% гомологичными или идентичными эталонной аминокислотной последовательности (например, любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем описании) или эталонной нуклеотидной последовательности (например, любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем описании). В конкретных вариантах осуществления такая последовательность является на по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 99% или по меньшей мере приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной или нуклеотидной последовательности, используемой для сравнения.

Идентичность последовательностей можно определять с использованием программ анализа последовательностей (например, пакета программ для анализа последовательностей от Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, программ BLAST, BESTFIT, GAP или PILEUP/PRETTYBOX). Такая программа сопоставляет идентичные или сходные последовательности путем присвоения степени гомологии различным заменам, делециям и/или другим модификациям. Консервативные замены, как правило, включают замены внутри следующих групп: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; а также фенилаланин, тирозин. В качестве иллюстративного подхода к определению степени идентичности может быть использована программа BLAST, с балльной оценкой вероятности от e^{-3} до e^{-100} , являющейся показателем близкородственных последовательностей.

«Эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для достижения благоприятного или желаемого клинического результата после лечения. Эффективное количество можно вводить субъекту в одной или более дозах. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для ослабления, облегчения, стабилизации, обращения вспять или замедления прогрессирования заболевания, или иного уменьшения патологических последствий заболевания. Эффективное количество может быть определено врачом в каждом конкретном случае, и находится в пределах компетенции специалиста в данной области. Как правило, при определении соответствующей дозы для достижения эффективного количества учитывают несколько факторов. Эти факторы включают возраст, пол и массу тела субъекта, состояние, подвергаемое лечению, степень тяжести состояния, а также форму и эффективную концентрацию вводимых клеток.

Используемый в настоящем описании термин «эндогенные» относится к молекуле нуклеиновой кислоты или полипептиду, которые обычно экспрессируются в клетке или ткани.

Используемый в настоящем описании термин «экзогенные» относится к молекуле нуклеиновой кислоты или полипептиду, которые не присутствуют эндогенно в клетке. Таким образом, термин «экзогенные» охватывает любые рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты или полипептиды, экспрессируемые в клетке, такие как инородные, гетерологичные и избыточно экспрессируемые молекулы нуклеиновой кислоты и полипептиды. Термин «экзогенная» нуклеиновая кислота относится к нуклеиновой кислоте, не присутствующей в естественной клетке дикого типа; например, экзогенная нуклеиновая кислота может отличаться от эндогенного аналога по последовательности, по положению/локализации или и тому, и другому. Для ясности, экзогенная нуклеиновая кислота может иметь такую же, или иную, последовательность в сравнении с ее естественным эндогенным аналогом; она может быть введена методами генетической инженерии в клетку в виде самой молекулы или ее предшественника, и может, необязательно, быть связана с альтернативными последовательностями контроля, такими как неприродный промотор или последовательность секреции.

Используемый в настоящем описании термин «гетерологичные молекулы нуклеиновой кислоты или полипептиды» относится к молекулам нуклеиновой кислоты (например, молекулам кДНК, ДНК или РНК) или полипептидам, которые обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки. Такие нуклеиновые кислоты могут происходить из другого организма или могут представлять собой, например, молекулы мРНК, которые обычно не экспрессируются в клетке или образце.

Термин «модулировать» означает положительно или отрицательно изменять. Иллюстративные модуляции включают изменение на приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 25%, приблизительно 50%, приблизительно 75% или приблизительно 100%.

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

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

Термины «выделенный», «очищенный» или «биологически чистый» относятся к материалу, который в той или иной степени свободен от компонентов, которые обычно сопутствуют ему в его естественном состоянии. Термин «выделять» относится к степени отделения от исходного источника или окружения. Термин «очищать» относится к степени отделения, которая выше, чем в случае выделения. «Очищенный» или «биологически чистый» белок является практически свободным от других материалов, таких как любые примеси, которые материально не влияют на биологические свойства белка или не вызывают другие неблагоприятные последствия. То есть, нуклеиновая кислота или пептид

являются очищенными, если они практически свободны от клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды, в случае их получения методами рекомбинантных ДНК, либо химических предшественников или других химических реагентов, в случае их химического синтеза. Чистоту и гомогенность, как правило, определяют аналитическими химическими методами, например, электрофорезом в полиакриламидном геле или высокоэффективной жидкостной хроматографией. Термин «очищенные» может означать, что нуклеиновая кислота или белок образуют практически одну полосу при электрофорезе в геле. В случае белка, который был подвергнут модификациям, например, фосфорилированию или гликозилированию, разные модификации могут приводить к получению разных выделенных белков, которые могут быть очищены отдельно.

Термин «выделенная клетка» означает клетку, которая отделена от молекулярных и/или клеточных компонентов, естественным образом сопровождающих клетку.

Используемый в настоящем описании термин «антигенсвязывающий домен» означает домен, способный специфически связывать конкретную антигенную детерминанту, или набор антигенных детерминант, на клетке.

Термин «новообразование» означает заболевание, характеризующееся патологической пролиферацией клетки или ткани, и ее последующей миграцией, или инвазией, в другие ткани или органы. Неопластический рост, как правило, является неконтролируемым и прогрессирующим, и происходит в условиях, которые не вызывают, или вызывают прекращение, размножения нормальных клеток. Новообразования могут поражать клетки, ткани или органы разных типов, включая, но без ограничения, орган, выбранный из группы, состоящей из мочевого пузыря, кости, головного мозга, молочной железы, хряща, глии, пищевода, фаллопиевой трубы, желчного пузыря, сердца, кишечника, почки, печени, легкого, лимфатического узла, нервной ткани, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, скелетной мышцы, кожи, спинного мозга, селезенки, желудка, яичек, тимуса, щитовидной железы, трахеи, мочеполового тракта, мочеточников, уретры, матки и влагалища, либо ткани или клетки из них. Новообразования включают такие виды рака, как саркомы, карциномы или плазмацитомы (злокачественная опухоль из плазматических клеток). Новообразование может представлять собой первичную опухоль, или первичный рак. Кроме того, новообразование может иметь метастатический статус.

Термин «рецептор» означает полипептид, или его фрагмент, присутствующий на клеточной мембране, который избирательно связывает один или более лигандов.

Термин «узнает» означает избирательно связывает мишень. Т-клетка, которая узнает опухоль, может экспрессировать рецептор (например, TCR или CAR), который связывает опухолевый антиген.

«Эталон», или «контроль», означает стандарт для сравнения. Например, уровень связывания scFv с антигеном в случае клетки, экспрессирующей CAR и scFv, может быть сравнен с уровнем связывания scFv с антигеном в случае соответствующей клетки, экспрессирующей только CAR.

Термин «секретируемый» относится к полипептиду, который высвобождается из клетки секреторным путем через эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, и в виде везикула, временно слитого с клеточной плазматической мембраной, который высвобождает белки за пределами клетки.

Термин «сигнальная последовательность» или «лидерная последовательность» означает пептидную последовательность (например, из 5, 10, 15, 20, 25 или 30 аминокислот), присутствующую на N-конце заново синтезированных белков, которая направляет их вход в секреторный путь.

Выражения «специфически связывает» или «специфически связывается с», или «специфически нацелен на» относятся к полипептиду, или его фрагменту, который узнает и/или связывает интересующую биологическую молекулу (например, полипептид, например, полипептид CD371), но который практически не узнает и/или не связывает другие молекулы в образце, например, биологическом образце, который естественным образом содержит описанный в настоящем описании полипептид (например, полипептид CD371).

Термины «содержит», «содержащий», и так далее, должны иметь широкое значение, которое приписано им в патентном законодательстве США, и могут означать «включает», «включающий» и тому подобное.

Используемый в настоящем описании термин «лечение» означает клиническое вмешательство в попытке изменения течения заболевания у индивидуума, получающего лечение, или клетки, которое может быть произведено либо для профилактики, либо в процессе развития клинической патологии. Терапевтические эффекты лечения включают, без ограничения, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или временное облегчение болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза. В качестве предотвращения прогрессирования заболевания или нарушения лечение может предотвращать ухудшение состояния вследствие нарушения у субъекта с заболеванием или диагностированным заболеванием, или у субъекта, предположительно имеющего заболевание, но лечение может также предотвращать начало развития заболевания или симптома заболевания у субъекта, имеющего риск развития заболевания или предположительно имеющего заболевание.

Используемый в настоящем описании термин «индивидуум», или «субъект», относится к позвоночному, такому как человек или отличное от человека животное, например, млекопитающее. Млекопитающие включают, но без ограничения, людей, приматов, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, грызунов и домашних животных. Неограничивающие примеры отличных от человека животных-субъектов включают грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; кроликов; собак; кошек; овец; свиней; коз; крупный рогатый скот; лошадей; а также приматов, таких как человекообразные обезьяны и маргитышки. Используемый в настоящем описании термин

«имеющий иммунную недостаточность» относится к субъекту с ослабленным иммунитетом. Субъект очень уязвим для оппортунистических инфекций - инфекций, вызванных микроорганизмами, которые обычно не вызывают заболевание у человека со здоровой иммунной системой, но могут поражать людей с плохо функционирующей или подавленной иммунной системой.

Другие аспекты описанного в настоящем описании изобретения приведены в следующем далее подробном описании и находятся в рамках описанного в настоящем описании объекта изобретения.

5.2. CD371

CD371 (CEC12A), также известный как DCAL-2, MICL или CLL-1, представляет собой 30-кДа относящийся к лектинам С-типа трансмембранный гликопротеин. Он экспрессируется на моноцитах, гранулоцитах, клетках - естественных киллерах (NK) и базофилах. CD371 представляет собой иммуноингибирующий рецептор, который рекрутирует Src-гомологичные фосфатазы SHP-1 и SHP-2 к своему фосфорилированному цитоплазматическому иммунорецепторному тирозиновому ингибирующему мотиву (ITIM) (Sancho *et al.*, *Annu Rev. Immunol* (2012); 30:491-529; Yan *et al.*, *Front Immunol* (2015);6:408; Lahoud *et al.*, *J Immunol* (2011);187:842). CD371 был определен как отрицательный регуляторный рецептор кристаллов мочевой кислоты (урата натрия, MSU), который контролирует аутоиммунитет и воспалительные заболевания (Neumann *et al.*, *Immunity* (2014);40:389-99). CD371 является отрицательным регулятором функции гранулоцитов и моноцитов (Marshall *et al.*, *J Biol Chem* (2004);279(15):14792-802; Pyz *et al.*, *Eur J Immunol* (2008);38(4):1157-63).

В конкретных вариантах осуществления CD371 представляет собой CD371 человека, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности с регистрационным № NCBI: NP_612210.4 (SEQ ID NO: 15) или ее фрагмента.

SEQ ID NO: 15 приведена ниже:

MSEEVTYADL QFQNSSEMEK IPEIGKFGEK APPAPSHVWR PAALFLTLLC
LLLLIGLGLV

ASMFHVTLKI EMKKMNKLQN ISEELQRNIS LQLMSNMNIS NKIRNLSTTL
QTIATKLCRE

LYSKEQEHKC KPCPRRWIWH KDSCYFLSDD VQTWQESKMA CAAQNASLLK
INNKNALFEI

KSQSRSYDYW LGLSPEEDST RGMRVNDIIN SSAWVIRNAP DLNNMYCGYI
NRLYVQYYHC

TYKKRMICEK MANPVQLGST YFREA [SEQ ID NO: 15]

В конкретных вариантах осуществления CD371 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере

приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%, по меньшей мере приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15, или ее фрагменту.

5.3. Антиген-узнающие рецепторы

Описанные в настоящем описании антиген-узнающие рецепторы специфически нацелены на, или связывают, CD371. В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR). В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой TCR-подобную слитую молекулу.

Описанное в настоящем описании изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим описанные в настоящем описании антиген-узнающие рецепторы. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD371-нацеленного антиген-узнающего рецептора, описанного в настоящем описании.

5.3.1. Т-клеточный рецептор (TCR)

В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой TCR. TCR представляет собой связанный дисульфидными связями гетеродимерный белок, состоящий из двух переменных цепей, экспрессируемых в виде части комплекса с неизменными молекулами цепи CD3. TCR, находящийся на поверхности Т-клеток, отвечает за узнавание антигенов в виде пептидов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). В конкретных вариантах осуществления TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь (закодированные TRA и TRB, соответственно). В конкретных вариантах осуществления TCR содержит гамма-цепь и дельта-цепь (закодированные TRG и TRD, соответственно).

Каждая цепь TCR состоит из двух внеклеточных доменов: переменной (V) области и константной (C) области. Константная область находится ближе к клеточной мембране, за ней следует трансмембранная область и короткий цитоплазматический фрагмент. Переменная область связывает комплекс пептид/МНС. Каждый из переменных доменов обеих цепей имеет три определяющие комплементарность области (области CDR).

В конкретных вариантах осуществления TCR может образовывать рецепторный комплекс с тремя димерными сигнальными модулями CD3 δ/ϵ , CD3 γ/ϵ и CD247 ζ/ζ или ζ/η . Когда комплекс TCR связывается со своим антигеном и МНС (пептид/МНС), Т-клетка, экспрессирующая комплекс TCR, активируется.

В конкретных вариантах осуществления TCR представляет собой эндогенный TCR. В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой природный TCR.

В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой экзогенный TCR. В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой рекомбинантный TCR. В конкретных вариантах

осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой не существующий в природе TCR. В конкретных вариантах осуществления не существующий в природе TCR отличается от любого природного TCR по меньшей мере одним аминокислотным остатком. В конкретных вариантах осуществления не существующий в природе TCR отличается от любого природного TCR по меньшей мере приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100 или более аминокислотными остатками. В конкретных вариантах осуществления не существующий в природе TCR модифицирован из природного TCR за счет изменения по меньшей мере одного аминокислотного остатка. В конкретных вариантах осуществления не существующий в природе TCR модифицирован из природного TCR за счет изменения по меньшей мере приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100 или более аминокислотных остатков.

5.3.2. Химерный антигенный рецептор (CAR)

В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой CAR. CAR представляют собой рекомбинантные рецепторы, которые приносят или придают интересующую специфичность иммунной эффекторной клетке. CAR могут быть использованы для придания специфичности моноклонального антитела Т-клетке; при этом перенос их кодирующей последовательности происходит за счет ретровирусных векторов.

Существуют три поколения CAR. CAR «первого поколения», как правило, состоят из внеклеточного антигенсвязывающего домена (например, scFv), который слит с трансмембранным доменом, который слит с цитоплазматическим/внутриклеточным сигнальным доменом. CAR «первого поколения» могут обеспечивать *de novo* узнавание антигена и вызывать активацию как CD4⁺, так и CD8⁺, Т-клеток через их сигнальный домен CD3ζ-цепи в одной слитой молекуле, независимо от HLA-опосредованного представления антигена. В CAR «второго поколения» к цитоплазматическому фрагменту CAR добавлены внутриклеточные сигнальные домены из разных костимулирующих молекул (например, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40) для обеспечения дополнительных сигналов Т-клеткам. CAR «второго поколения» представляют собой CAR, которые обеспечивают как костимуляцию (например, CD28 или 4-1BB), так и активацию (CD3ζ). CAR «третьего поколения» представляют собой CAR, которые обеспечивают множественную костимуляцию (например, CD28 и 4-1BB) и активацию (CD3ζ). В конкретных вариантах осуществления

антиген-узнающий рецептор представляет собой CAR первого поколения. В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой CAR, который не содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы или его фрагмент. В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет собой CAR второго поколения.

В конкретных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD371, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

5.3.2.1. Внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой scFv. В конкретных вариантах осуществления scFv представляет собой scFv человека. В конкретных вариантах осуществления scFv представляет собой гуманизированный scFv. В конкретных вариантах осуществления scFv представляет собой мышиный scFv. В конкретных вариантах осуществления scFv определяют путем скрининга библиотеки scFv в фаге при помощи слитого белка антиген-Fc.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой Fab. В конкретных вариантах осуществления Fab является сшитым. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой F(ab)₂.

Любая из вышеуказанных молекул может находиться в слитом белке с гетерологичной последовательностью, образуя внеклеточный антигенсвязывающий домен. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (представляющий собой, например, scFv или его аналог) связывает CD371 (например, CD371 человека) с константой диссоциации (K_d), составляющей приблизительно 1×10^{-6} М или менее, например, приблизительно 1×10^{-7} М или менее, приблизительно 1×10^{-8} М или менее, приблизительно 1×10^{-9} М или менее, приблизительно 1×10^{-10} М или менее, или приблизительно 1×10^{-11} М или менее. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывает CD371 (например, CD371 человека) с K_d , составляющей приблизительно 1×10^{-7} М или менее. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывает CD371 (например, CD371 человека) с K_d , составляющей приблизительно 1×10^{-8} М или менее. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывает CD371 (например, CD371 человека) с K_d , составляющей приблизительно $1,5 \times 10^{-8}$ М или приблизительно 1×10^{-8} М. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывает CD371 (например, CD371 человека) с K_d , составляющей от приблизительно 1×10^{-8} М до приблизительно 1×10^{-7} М.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывает CD371 (например, CD371 человека) с низкой аффинностью связывания. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR

связывает CD371 (например, CD371 человека) с K_d , составляющей приблизительно $1,5 \times 10^{-8}$ М или более, приблизительно 1×10^{-8} М или более, приблизительно 1×10^{-7} М или более, или приблизительно 1×10^{-6} М или более.

Связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена CAR может быть подтверждено, например, твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA), радиоиммунным анализом (RIA), FACS-анализом, биоанализом (например, ингибированием роста) или вестерн-блот анализом. В каждом из этих анализов, как правило, обнаруживают присутствие интересующих комплексов белок-антитело за счет использования меченого реагента (например, антитела или scFv), специфического для интересующего комплекса. Например, scFv можно радиоактивно метить и использовать в радиоиммунном анализе (RIA) (смотри, например, публикацию Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, включенную в настоящее описание посредством ссылки). Радиоактивный изотоп может быть обнаружен, например, при помощи γ -счетчика или сцинтилляционного счетчика, или методом автордиографии. В конкретных вариантах осуществления CD371-нацеленный внеклеточный антигенсвязывающий домен помечен флуоресцентным маркером. Неограничивающие примеры флуоресцентных маркеров включают зеленый флуоресцентный белок (GFP), синий флуоресцентный белок (например, EBFP, EBFP2, Azurite и mKalama1), циановый флуоресцентный белок (например, ECFP, Cerulean и CyPet) и желтый флуоресцентный белок (например, YFP, Citrine, Venus и YPet). В одном варианте осуществления CD371-нацеленный scFv человека помечен GFP.

В конкретных вариантах осуществления области CDR определены в соответствии с системой нумерации IMGT.

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

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен

CAR (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 2 приведена в Таблице 1, ниже.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 28-30 приведены в Таблице 1.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 31-33 приведены в Таблице 1.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область тяжелой цепи (V_H). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 107, которая приведена в Таблице 1. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «B10H4L».

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «B10L4H». Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, приведена в SEQ ID NO: 22. SEQ ID NO: 16 и 22 приведены в Таблице 1, ниже.

Таблица 1

Антиген	Полипептид CD371, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или ее фрагмента		
Области	1	2	3

CDR			
V _H	GFTFSDYQ [SEQ ID NO: 28]	IQGGGGST [SEQ ID NO: 29]	AREMWRGDYYSGMDV [SEQ ID NO: 30]
V _L	QSVLDSYNNENN [SEQ ID NO: 31]	WAS [SEQ ID NO: 32]	QQYTSEPIT [SEQ ID NO: 33]
Полная V _H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYSGMDVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 1]		
Полная V _L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLA WYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYTS EPITFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 2]		
V _L -V _H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLA WYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYTS EPITFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYSGMDVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 16]		
ДНК для V _L -V _H scFv	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC GAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAG CTATAACAATGAGAACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGAC AGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCCGGAATCCGGGG TCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGC AATATAACCAGCGAACCTATCACGTTCCGCCAAGGTACCAAGGTGGAA ATCAAAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCTC CGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTCAGGGTGGCGGTGGTAGCAC ATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACA ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTA CТАCTCCGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCA [SEQ ID NO: 22]		

V_H - V_L scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWV SGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REMWRGDYYS GMDVWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIV MTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYTSEPI FGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 107]
-----------------------	---

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 3 приведена в Таблице 2, ниже.

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

V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область тяжелой цепи (V_H). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 108, которая приведена в Таблице 2. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «C3H4L».

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «C3L4H». Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, приведена в SEQ ID NO: 23. SEQ ID NO: 17 и 23 приведены в Таблице 2, ниже.

Таблица 2

Антиген	Полипептид CD371, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или ее фрагмента		
Области CDR	1	2	3
V_H	GFTFTSYA [SEQ ID NO: 34]	IDGSGGGT [SEQ ID NO: 35]	ARAYYDIL [SEQ ID NO: 36]
V_L	QSVLSSYNNENN [SEQ ID NO: 37]	AAS [SEQ ID NO: 38]	QQYYSEPYT [SEQ ID NO: 39]

Полная V _H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVS GIDGSGGGTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR AYYDILTGYPVDGMDVWGQGT TTVTVSS [SEQ ID NO: 3]
Полная V _L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSYNNENNLAWYQQKPGQPP KLLIYA ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSEP YTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 4]
V _L -V _H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSYNNENNLAWYQQKPGQPP KLLIYA ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSEP YTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIDGSGGGTNYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYYDILTGYPVDGMDVW GQGT TTVTVSS [SEQ ID NO: 17]
ДНК для V _L -V _H scFv	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC GAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAAGCAGC TATAACAATGAGAACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACA GCCTCCTAAGCTGCTCATTACGCCGCATCTACCCGGGAATCCGGGGT CCCTGACCGATT CAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCAC CATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCA ATATTATAGCGAACCTTATACGTTCCGCCAAGGTACCAAGGTGGAAT CAAAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCTCCGG TGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTAC CTTACCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG GCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTGACGGTAGCGGTGGTGGCACAAATTA CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCAA GAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGG CTGTGTATTACTGTGCGAGAGCGTATTACGATATTTGACTGGTTACCC CGTGGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCA [SEQ ID NO: 23]
V _H -V _L scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVS GIDGSGGGTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR AYYDILTGYPVDGMDVWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSYNNENNLAWYQQKPGQPPK LLIYA ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSEPYT FGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 108]

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 5 приведена в Таблице 3, ниже.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. SEQ ID NO: 6 приведена в Таблице 3, ниже.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, или ее консервативную модификацию.

SEQ ID NO: 40-42 приведены в Таблице 3.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 43-45 приведены в Таблице 3.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45, или ее консервативную модификацию.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область тяжелой цепи (V_H). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В

конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 109, которая приведена в Таблице 3. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «D6H4L».

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «D6L4H». Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, приведена в SEQ ID NO: 24. SEQ ID NO: 18 и 24 приведены в Таблице 3, ниже.

Таблица 3

Антиген	Полипептид CD371, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или ее фрагмента		
	1	2	3
Области CDR			
V_H	GFTFTDYA [SEQ ID NO: 40]	IDGSGGST [SEQ ID NO: 41]	ALELGATTVY [SEQ ID NO: 42]
V_L	QSVLRSSNN KNN [SEQ ID NO: 43]	AAS [SEQ ID NO: 44]	QQYYREPLT [SEQ ID NO: 45]
Полная V_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIDGSGGSTDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALELGATTVYWGQGLVTVSS [SEQ ID NO: 5]		
Полная V_L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLRSSNNKNNLAWYQQKPGQPKLLIYAASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYREPLTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 6]		
V_L - V_H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLRSSNNKNNLAWYQQKPGQPKLLIYAASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYREPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIDGSGGSTDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALELGATTVYWGQGT		

	LVTVSS [SEQ ID NO: 18]
ДНК для V_L - V_H scFv	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG CGAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTACGCA GCAGCAACAATAAAAACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGG ACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCCGCATCTACCCGGGAATCCG GGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTG TCAGCAATATTATCGCGAACCTCTGACGTTTCGGCCAAGGTACCAAGG TGGAATCAAAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTTCCTGGCGGC GGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACCTTTACCGACTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGACATTGACGGTAGCGGTG GTAGCACAGACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCC CGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCG TGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCTAGAGCTGGGAGCTA CTACCGTCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 24]
V_H - V_L scFv	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMSWVRQAPGKGLEWV SDIDGSGGSTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA LELGATTVYWQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPD SLAVSLGERATINCKSSQSVLRSSNNKNNLAWYQKPGQPPKLLIYAAS TRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQYYREPLTFGQGT KVEIK [SEQ ID NO: 109]

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%,

приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7. SEQ ID NO: 7 приведена в Таблице 4, ниже.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8. SEQ ID NO: 8 приведена в Таблице 4, ниже.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 46-48 приведены в Таблице 4.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 49-51 приведены в Таблице 4.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:

47, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51, или ее консервативную модификацию.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В конкретных вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена переменная область тяжелой цепи (V_H). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, переменные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 110, которая приведена в Таблице 4. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «A11H4L».

В конкретных вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена переменная область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, переменные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «A11L4H». Иллюстративная нуклеотидная

последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, приведена в SEQ ID NO: 25. SEQ ID NO: 19 и 25 приведены в Таблице 4, ниже.

Таблица 4

Антиген	Полипептид CD371, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или ее фрагмента		
Области CDR	1	2	3
V _H	GFTFTSTQ [SEQ ID NO: 46]	ISGYGGST [SEQ ID NO: 47]	AKDTEVSGDAFDI [SEQ ID NO: 48]
V _L	QSV DSSN [SEQ ID NO: 49]	GAS [SEQ ID NO: 50]	QQYRSWPIT [SEQ ID NO: 51]
Полная V _H	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTQMSWVRQAPGKGLEWVSEISGYGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTEVSGDAFDIWGQGMVTVSS [SEQ ID NO: 7]		
Полная V _L	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV DSSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYRSWPITFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 8]		
V _L -V _H scFv	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV DSSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYRSWPITFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTQMSWVRQAPGKGLEWVSEISGYGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTEVSGDAFDIWGQGMVTVSS [SEQ ID NO: 19]		
ДНК для V _L -V _H scFv	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAACGTGCCACCCTCTCCTGCCGTGCCAGTCAGAGTGTTGACAGCAGCAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCCGACTCCTCATCTATGGCGCATCTAGCCGTGCCACTGGTATCCCAGACCGTTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTG GAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTGTGTCAGCAGTATCGCAGCTG GCCTATCACGTTCCGCCAAGGTACCAAGGTGGAATCAAAGGTGGTG GTGGTTCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTACCAG		

	CACCCAGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGGGTGTCAGAGATTAGCGGTTATGGTGGTAGCACATACTACGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACA CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTG TATTACTGTGCAAAAGACACGGAGGTTTCGGGAGATGCTTTTGATAT CTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA [SEQ ID NO: 25]
V _H -V _L scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTQMSWVRQAPGKGLEWV SEISGYGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KDTEVSGDAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQ SPGTLSPGERATLSCRASQSVDSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYRSWPITFGQGTKVEI K [SEQ ID NO: 110]

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 9 приведена в Таблице 5, ниже.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%,

приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10. SEQ ID NO: 10 приведена в Таблице 5, ниже.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 52-54 приведены в Таблице 5.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 55-57 приведены в Таблице 5.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, или ее консервативную модификацию.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:

56, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В конкретных вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена переменная область тяжелой цепи (V_H). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, переменные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 111, которая приведена в Таблице 5. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «E4H4L».

В конкретных вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена переменная область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, переменные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «E4L4H». Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, приведена в SEQ ID NO: 26. SEQ ID NO: 20 и 26 приведены в Таблице 5, ниже.

Таблица 5

Антиген	Полипептид CD371, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или ее фрагмента		
	1	2	3
Области CDR			
V_H	GFTFTSYY [SEQ ID NO: 52]	ISGSGDST [SEQ ID NO: 53]	AREAGGDYDSGAFDI [SEQ ID NO: 54]
V_L	QSVLYSGNNKNY [SEQ ID NO: 55]	GAS [SEQ ID NO: 56]	QQYDYAPFT [SEQ ID NO: 57]
Полная	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYMSWVRQAPGKLEWVS		

V _H	GISGSGDSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE AGGDYDSGAFDIWGQGMVTVSS [SEQ ID NO: 9]
Полная V _L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSGNNKNYLAWYQQKPGQP PKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYDYA PFTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 10]
V _L -V _H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSGNNKNYLAWYQQKPGQP PKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYDYA PFTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFTSY YMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGDSTSYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREAGGDYDSGAFDIWGQGM TVTVSS [SEQ ID NO: 20]
ДНК для V _L -V _H scFv	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC GAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATATAGC GGCAACAATAAAA ACTATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACA GCCTCCTAAGCTGCTCATTACGGCGCATCTACCCGGGAATCCGGGGT CCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCAC CATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCA ATATGACTATGCCCCTTTTACGTTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAAT CAAAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCTCCGG TGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTAC CTTTACCAGCTATTATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG GCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTAGCGGTAGCGGTGACAGCACAAGCT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACG GCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGCAGGTGGTACTACGATAGTGGT GCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA [SEQ ID NO: 26]
V _H -V _L scFv	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSY YMSWVRQAPGKGLEWVS GISGSGDSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE AGGDYDSGAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQ SPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSGNNKNYLAWYQQKPGQP PKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYDYA PFTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 111]

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен

CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11. SEQ ID NO: 11 приведена в Таблице 6, ниже.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. SEQ ID NO: 12 приведена в Таблице 6, ниже.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 58-60 приведены в Таблице 6.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 61-63 приведены в Таблице 6.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, или ее консервативную модификацию.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область тяжелой цепи (V_H). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 112, которая приведена в Таблице 6. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «E8H4L».

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21. В конкретных вариантах осуществления scFv имеет обозначение «E8L4H». Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, приведена в SEQ ID NO: 27. SEQ ID NO: 21 и 27 приведены в Таблице 6, ниже.

Таблица 6

Антиген	Полипептид CD371, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или ее фрагмента		
Области CDR	1	2	3
V_H	GFTFSSYA [SEQ ID NO: 58]	IDGEGGYT [SEQ ID NO: 59]	AREGVDYDILTGYYPYGMDV [SEQ ID NO: 60]
V_L	QSVLDSSNNKKNY [SEQ ID NO: 61]	DAS [SEQ ID NO: 62]	QQGTSSPLT [SEQ ID NO: 63]
Полная V_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSEIDGEGGYTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EGVVDYDILTGYYPYGMDVWGQGT TTVTVSS [SEQ ID NO: 11]		
Полная V_L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSSNNKNYLAWYQQKPGQPKLLIYDASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGTSSPLTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 12]		
V_L - V_H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSSNNKNYLAWYQQKPGQPKLLIYDASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGTSSPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSEIDGEGGYTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGVVDYDILTGYYPYGMDVWGQGT TTVTVSS [SEQ ID NO: 21]		
ДНК для V_L - V_H	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC GAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAGC		

scFv	AGCAACAATAAAAACTATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACA GCCTCCTAAGCTGCTCATTACGACGCATCTACCCGGGAATCCGGGGT CCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCAC CATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCA AGGCACCAGCAGCCCTCTGACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAA TCAAAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCTCCG GTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTC ACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTGTCAGAGATTGACGGTGAGGGTGGTTATACAAA TTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACA CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGGGGTAGATTACGATATTTGA CTGGTTATTATCCTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 27]
V _H -V _L scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS EIDGEGGYTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EGVDYDILTGYYPYGMDVWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSSNNKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYDASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGTSSP LTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 112]

Используемый в настоящем описании термин «консервативная модификация последовательности» означает аминокислотную модификацию, которая существенно не влияет на, или не изменяет, характеристики связывания нацеленного на мезотелин CAR, описанного в настоящем описании (например, внеклеточного антигенсвязывающего домена CAR), содержащего данную аминокислотную последовательность. Консервативные модификации могут включать аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть внесены во внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR стандартными методами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Аминокислоты могут быть разделены на группы в соответствии с их физико-химическими свойствами, такими как заряд и полярность. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотой из той же группы. Например, аминокислоты могут быть классифицированы на основании заряда: положительно заряженные аминокислоты включают лизин, аргинин, гистидин, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, нейтральные аминокислоты включают аланин, аспарагин, цистеин,

глутамин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин. Кроме того, аминокислоты могут быть классифицированы на основании полярности: полярные аминокислоты включают аргинин (основная полярная), аспарагин, аспарагиновую кислоту (кислая полярная), глутаминовую кислоту (кислая полярная), глутамин, гистидин (основная полярная), лизин (основная полярная), серин, треонин, и тирозин; неполярные аминокислоты включают аланин, цистеин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин. Таким образом, один или более аминокислотных остатков в области CDR можно заменять другими аминокислотными остатками из той же группы, и измененное антитело можно тестировать на сохранение функции (то есть, функций, указанных в пунктах (с) - (l) выше) с использованием функциональных анализов, описанных в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления не более одного, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти остатков в указанной последовательности или области CDR являются измененными.

Аминокислотные последовательности V_H и/или V_L , имеющие по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95% (например, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) гомологии или идентичности с определенной последовательностью (например, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12), могут иметь замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно определенной последовательности(ей), но сохраняют способность к связыванию целевого антигена (например, мезотелина). В конкретных вариантах осуществления всего 1-10 аминокислот заменены, вставлены и/или удалены в определенной последовательности (например, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12). В конкретных вариантах осуществления замены, вставки и делеции имеют место в областях за пределами областей CDR (например, в областях FR) внеклеточного антигенсвязывающего домена. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит последовательность V_H и/или V_L , выбранную из SEQ ID NO: 1-12, включая посттрансляционные модификации этой последовательности (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12).

В настоящем описании процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями эквивалентен проценту идентичности между двумя последовательностями. Процент идентичности между двумя последовательностями

зависит от числа идентичных положений в обеих последовательностях (то есть, % гомологии=число идентичных положений/общее число положений \times 100), с учетом количества делеций, и длины каждой делеции, которые должны быть внесены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с использованием математического алгоритма.

Процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма Майерса-Миллера (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафом за продление делеции 12 и штрафом за внесение делеции 4. Кроме того, процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), который включен в программу GAP в пакете программ GCG (доступном по сетевому адресу www.gcg.com), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, штрафом за внесение делеции 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафом за продление делеции 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Дополнительно или альтернативно, аминокислотные последовательности по описанному в настоящем описании изобретению можно также использовать в качестве «искомой последовательности» для проведения поиска в общедоступной базе данных, например, для выявления родственных последовательностей. Такие поиски можно проводить с использованием программы XBLAST (версия 2.0), описанной в публикации Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. BLAST поиски белков можно проводить при помощи программы XBLAST, количество баллов=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных определенным последовательностям (например, последовательностям переменных областей тяжелой и легкой цепей scFv m903, m904, m905, m906 и m900), описанным в настоящем описании. Для получения выравниваний с делециями для целей сравнения можно использовать программу Gapped BLAST, как описано в публикации Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR перекрестно конкурирует за связывание CD371 (например, CD371 человека) с эталонным антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_L , например, любого из описанных в настоящем описании scFv (например, V10, C3, D6, A11, E4 и D8). В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR перекрестно конкурирует за связывание CD371 (например, CD371 человека) с эталонным антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим последовательности V_H и V_L , например, любого из описанных в настоящем описании scFv

(например, V10, C3, D6, A11, E4 и D8).

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR перекрестно конкурирует за связывание CD371 (например, CD371 человека) с эталонным антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_L из scFv B10. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR перекрестно конкурирует за связывание CD371 (например, CD371 человека) с эталонным антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR перекрестно конкурирует за связывание CD371 (например, CD371 человека) с эталонным антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим последовательности V_H и V_L из scFv B10. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR перекрестно конкурирует за связывание CD371 (например, CD371 человека) с эталонным антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает тот же эпитоп на CD371 (например, CD371 человека), что и эталонное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR связывает тот же эпитоп на CD371 (например, CD371 человека), что и эталонное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_L , например, любого из описанных в настоящем описании scFv (например, B10, C3, D6, A11, E4 и E8). В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR связывает тот же эпитоп на EMR2 (например, EMR2 человека), что и эталонное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательности V_H и V_L , например, любого из описанных в настоящем описании scFv (например, B10, C3, D6, A11, E4 и E8).

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR связывает тот же эпитоп на CD371 (например, CD371 человека), что и эталонное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент,

содержащее последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_L из scFv B10. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR связывает тот же эпитоп на CD371 (например, CD371 человека), что и эталонное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28; V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR связывает тот же, или по существу тот же, эпитоп на CD371 (например, CD371 человека), что и эталонное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее последовательности V_H и V_L из scFv B10. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR связывает тот же эпитоп на CD371 (например, CD371 человека), что и эталонное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

Внеклеточные антигенсвязывающие домены, которые перекрестно конкурируют, или конкурируют, с эталонным антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, за связывание CD371 (например, CD371 человека), можно идентифицировать с использованием обычных способов, известных в данной области, включая, но без ограничения, анализы ELISA, радиоиммунные анализы (RIA), Biacore, проточную цитометрию, вестерн-блоттинг, а также любые другие подходящие количественные или качественные анализы связывания антитела. Конкурентный анализ ELISA описан в руководстве Morris, «Epitope Mapping of Protein Antigens by Competition ELISA», *The Protein Protocols Handbook* (1996), pp. 595-600, под редакцией J. Walker, полное содержание которого включено посредством ссылки. В конкретных вариантах осуществления анализы связывания антитела включают измерение начального связывания эталонного антитела с полипептидом CD371, смешивание эталонного антитела с тестируемым внеклеточным антигенсвязывающим доменом, измерение второго связывания эталонного антитела с полипептидом CD371 в присутствии тестируемого внеклеточного антигенсвязывающего домена, и сравнение начального связывания со вторым связыванием эталонного антитела, где уменьшение второго связывания эталонного антитела с полипептидом CD371 в сравнении с начальным связыванием указывает на то, что тестируемый внеклеточный антигенсвязывающий домен перекрестно конкурирует с эталонным антителом за связывание CD371, например, антителом, которое узнает тот же, или по существу тот же, эпитоп, перекрывающийся эпитоп или соседний эпитоп. В конкретных вариантах

осуществления эталонное антитело метят, например, флуорохромом, биотином или пероксидазой. В конкретных вариантах осуществления полипептид CD371 экспрессируется в клетках, например, при определении методом проточной цитометрии. В конкретных вариантах осуществления полипептид CD371 иммобилизуют на поверхности, включая чип *Viasore* (например, в анализе *Viasore*), или другой среде, подходящей для анализа методом поверхностного плазмонного резонанса. Связывание эталонного антитела в присутствии полностью постороннего антитела (которое не связывает CD371) может служить в качестве контрольного высокого значения. Контрольное низкое значение может быть получено путем инкубации меченого эталонного антитела с немеченым эталонным антителом, при этом будет иметь место конкуренция и уменьшение связывания меченого эталонного антитела. В конкретных вариантах осуществления тестируемый внеклеточный антигенсвязывающий домен, который уменьшает связывание эталонного антитела с полипептидом CD371 на по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95%, считают внеклеточным антигенсвязывающим доменом, перекрестно конкурирующим с эталонным антителом за связывание CD371. В конкретных вариантах осуществления анализы выполняют при комнатной температуре.

В конкретных вариантах осуществления анализ связывания антитела включает определение начального связывания тестируемого внеклеточного антигенсвязывающего домена с полипептидом CD371, смешивание внеклеточного антигенсвязывающего домена с эталонным антителом, определение второго связывания тестируемого внеклеточного антигенсвязывающего домена с полипептидом CD371 в присутствии эталонного антитела и сравнение начального связывания со вторым связыванием тестируемого внеклеточного антигенсвязывающего домена, где уменьшение второго связывания тестируемого внеклеточного антигенсвязывающего домена с полипептидом CD371 в сравнении с начальным связыванием указывает на то, что тестируемый внеклеточный антигенсвязывающий домен перекрестно конкурирует с эталонным антителом за связывание CD371, например, антителом, которое узнает тот же, или по существу тот же, эпитоп, перекрывающийся эпитоп или соседний эпитоп. В конкретных вариантах осуществления тестируемый внеклеточный антигенсвязывающий домен метят, например, флуорохромом, биотином или пероксидазой. В конкретных вариантах осуществления полипептид CD371 экспрессируется в клетках, например, при определении методом проточной цитометрии. В конкретных вариантах осуществления полипептид CD371 иммобилизуют на поверхности, включая чип *Viasore* (например, в анализе *Viasore*), или другой среде, подходящей для анализа методом поверхностного плазмонного резонанса. Связывание тестируемого внеклеточного антигенсвязывающего домена в присутствии полностью постороннего антитела (которое не связывает CD371) может служить в качестве

контрольного высокого значения. Контрольное низкое значение может быть получено путем инкубации меченого тестируемого внеклеточного антигенсвязывающего домена с немеченым тестируемым внеклеточным антигенсвязывающим доменом, при этом будет иметь место конкуренция и уменьшение связывания меченого тестируемого внеклеточного антигенсвязывающего домена. В конкретных вариантах осуществления тестируемый внеклеточный антигенсвязывающий домен, связывание которого с полипептидом CD371 уменьшается на по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95% в присутствии эталонного антитела, считают внеклеточным антигенсвязывающим доменом, перекрестно конкурирующим с эталонным антителом за связывание CD371. В конкретных вариантах осуществления анализы выполняют при комнатной температуре.

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем описании CAR содержит линкер, соединяющий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94.

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область тяжелой цепи (V_H). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L .

В конкретных вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CAR должны быть связаны друг с другом так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена была расположена вариабельная область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, вариабельные области расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H .

Кроме того, внеклеточный антигенсвязывающий домен может содержать лидер, или

сигнальный пептид, который направляет образующийся белок в эндоплазматический ретикулум. Сигнальный пептид, или лидер, может быть важен, если CAR будет гликозилированным и заякоренным в клеточной мембране. Сигнальная последовательность, или лидер, может представлять собой пептидную последовательность (длиной приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25 или приблизительно 30 аминокислот), находящуюся на N-конце заново синтезированных белков, которая направляет их вход в секреторный путь. В конкретных вариантах осуществления сигнальный пептид ковалентно связан с 5'-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена. В конкретных вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой полипептид CD8, например, CAR содержит укороченный сигнальный пептид CD8.

5.3.2.2. Трансмембранный домен CAR

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит гидрофобную альфа-спираль, которая проходит по меньшей мере через часть мембраны. Разные трансмембранные домены приводят к разной стабильности рецепторов. После узнавания антигена рецепторы образуют кластер, и сигнал передается в клетку. В соответствии с описанным в настоящем описании изобретением, трансмембранный домен CAR может содержать природный или модифицированный трансмембранный домен CD8 или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CD28 или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CD3 ζ или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CD4 или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен 4-1BB или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен OX40 или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен ICOS или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CD84 или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CD166 или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CD8a или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CD8b или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен ICAM-1 или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CTLA-4 или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CD27 или его фрагмент, природный или модифицированный трансмембранный домен CD40 или его фрагмент, NKGD2 или его фрагмент, или их сочетание.

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

В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD8 (например, трансмембранный домен CD8 или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD8 (например, трансмембранный домен CD8 человека или его фрагмент). В конкретных

вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей регистрационный № NCBI: NP_001139345.1 (SEQ ID NO: 64), или ее фрагменту, и/или может, необязательно, иметь от одной до двух или до трех консервативных аминокислотных замен. В конкретных вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывный фрагмент SEQ ID NO: 64, имеющий длину по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50, и до 235 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в различных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из последовательности аминокислот 1-235, 1-50, 50-100, 100-150, 150-200, 137-209 или 200-235 в SEQ ID NO: 64. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD8, содержащий, или состоящий из аминокислот 137-209 в SEQ ID NO: 64. SEQ ID NO: 64 приведена ниже.

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKQCQVLLSNPTSGCS
WLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYF
CSALSNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR
GLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS GDKPSLSARY
V [SEQ ID NO: 64]

В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD8 (например, трансмембранный домен CD8 мышцы или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей регистрационный № NCBI: AAA92533.1 (SEQ ID NO: 65), или ее фрагменту, и/или может, необязательно, иметь от одной до двух или до трех консервативных аминокислотных замен. В конкретных вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывный фрагмент SEQ ID NO: 65, имеющий длину по меньшей мере приблизительно 20 или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, или по меньшей мере приблизительно 60, или по меньшей мере приблизительно 70, или по меньшей мере приблизительно 100, или по меньшей мере приблизительно 200 и до 247 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в различных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из последовательности аминокислот 1-247, 1-50, 50-100, 100-150, 150-200, 151-219 или 200-247 в SEQ ID NO: 65. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный

домен CAR содержит полипептид CD8, содержащий, или состоящий из аминокислот 151-219 в SEQ ID NO: 65. SEQ ID NO: 65 приведена ниже.

1 MASPLTRFLS LNLLMGESI ILSGGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD
LVCEVLGSVS

61 QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNI TWDEKLNSSK LFS AVRDTNN
KYVLT LNKF S

121 KENEGYYFCS VISNSV MYFS SVVPVLQKVN STTKPVLRT PSPVHPTGTS
QPQRPEDCRP

181 RGSVKGTGLD FACDIYI WAP LAGICVAPLL SLITLICYH RSRKRVCKCP
RPLVRQEGKP

241 RPSEKIV [SEQ ID NO: 65]

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

В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей регистрационный № NCBI: NP_006130 (SEQ ID NO: 66), или ее фрагменту, и/или может, необязательно, иметь от одной до двух или до трех консервативных аминокислотных замен. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывный фрагмент SEQ ID NO: 66, имеющий длину по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50 и до 220 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в различных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из последовательности аминокислот 1-220, 1-50, 50-100, 100-150, 150-200, 153-179 или 200-220 в SEQ ID NO: 66. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28, содержащий, или состоящий из аминокислот 153-179 в SEQ ID NO: 66. SEQ ID NO: 66 приведена ниже:

1 MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNANLSC KYSYNLFSRE
FRASLHKGLD

61 SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY
FCKIEVMYPP

121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV
TVAFIIFWVR

181 SKRSRL LHSD YMNMTPRRPG PTRKHYPYA PPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 66]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты

153-179 в SEQ ID NO: 66, приведена в SEQ ID NO: 67, которая представлена ниже.

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
AACAGTGGCCTTTATTTCTGGGTG [SEQ ID NO: 67]

В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 мыши или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей регистрационный № NCBI: NP_031668.3 (SEQ ID NO: 68), или ее фрагменту, и/или может, необязательно, иметь от одной до двух или до трех консервативных аминокислотных замен. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывный фрагмент SEQ ID NO: 66, имеющий длину по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50 и до 218 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в различных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из последовательности аминокислот 1-220, 1-50, 50-100, 100-150, 150-200, 151-177 или 200-218 в SEQ ID NO: 68. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28, содержащий, или состоящий из аминокислот 151-177 в SEQ ID NO: 68. SEQ ID NO: 68 приведена ниже:

1 MTLRLLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSL S CRYSYNLLAK
EFRASLYKGV

61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FNETVTFRL WNLHVNHTDI
YFCKIEFMYP

121 PPYLDNERSN GTPIHKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV
ALCVIWTNSR

181 RNRLQLSDYM NMTPRRPGLT RKPYPYAPA RDFAAAYRP [SEQ ID NO: 68]

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления CAR также содержит область спейсера, которая связывает внеклеточный антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом. Область спейсера может быть достаточно гибкой, чтобы допускать ориентирование антигенсвязывающего домена в разных направлениях для облегчения узнавания антигена, с сохранением, при этом, активирующей активности CAR.

В конкретных вариантах осуществления область шарнира/спейсера CAR содержит природную или модифицированную шарнирную область CD8 или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область CD28 или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область CD3 ζ или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область CD40 или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область 4-1BB или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область OX40 или его фрагмента,

природную или модифицированную шарнирную область CD84 или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область CD166 или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область CD8a или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область CD8b или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область ICOS или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область ICAM-1 или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область CTLA-4 или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область CD27 или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область CD40 или его фрагмента, природную или модифицированную шарнирную область NKG2D или его фрагмента, синтетический полипептид (не на основе белка, связанного с иммунным ответом), или их сочетание. Область шарнира/спейсера может представлять собой шарнирную область из IgG1 или область CH₂CH₃ иммуноглобулина и части CD3, часть полипептида CD28 (например, часть SEQ ID NO: 66 или 68), часть полипептида CD8 (например, часть SEQ ID NO: 64 или 65), вариацию любых из вышеуказанных, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 100% гомологичной или идентичной им, или синтетическую последовательность спейсера.

5.3.2.3. Внутриклеточный сигнальный домен CAR

В конкретных вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит полипептид CD3ζ. CD3ζ может активировать или стимулировать клетку (например, клетку лимфоидной линии дифференцировки, например, Т-клетку). CD3ζ дикого типа («природная») содержит три функциональных иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотива (ITAM), три функциональных области богатых основными остатками фрагментов (BRS) (BRS1, BRS2 и BRS3). CD3ζ передает сигнал активации в клетку (например, клетку лимфоидной линии дифференцировки, например, Т-клетку) после связывания антигена. Внутриклеточный сигнальный домен CD3ζ-цепи является основным передатчиком сигналов от эндогенных TCR.

В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит природную CD3ζ. В конкретных вариантах осуществления полипептид CD3ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей регистрационный № NCBI: NP_932170 (SEQ ID NO: 69), или ее фрагменту, и/или может, необязательно, иметь от одной до двух или до трех консервативных аминокислотных замен. В конкретных неограничивающих вариантах

осуществления полипептид CD3 ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывный фрагмент SEQ ID NO: 69, имеющий длину по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50 и до 164 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в различных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD3 ζ содержит или состоит из последовательности аминокислот 1-164, 1-50, 50-100, 52-164, 100-150 или 150-164 в SEQ ID NO: 69. В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит полипептид CD3 ζ , содержащий, или состоящий из аминокислот 52-164 в SEQ ID NO: 69. SEQ ID NO: 69 приведена ниже:

1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF
LRVKFSRSAD

61 APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EYDVLDRR GRDPEMGGKP
QRRKNPQEGLYNELQKDKMA

121 EAYSEIGMKGERRRGKGDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID
NO: 69]

В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит полипептид CD3, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 89. SEQ ID NO: 89 приведена ниже.

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRR
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR [SEQ ID NO: 89]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, приведена в SEQ ID NO: 90, которая приведена ниже.

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT
CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTG
AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCA
GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGC
CCCCTCGC [SEQ ID NO: 90]

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR также содержит по меньшей мере костимулирующую сигнальную область. В конкретных вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область содержит по меньшей мере одну костимулирующую молекулу или ее фрагмент. В конкретных вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный домен по меньшей мере одной костимулирующей молекулы или его фрагмент.

Используемый в настоящем описании термин «костимулирующая молекула» относится к клеточной поверхностной молекуле, отличной от антигенного рецептора или его лиганда, которая может обеспечивать эффективный ответ лимфоцитов на антиген. В

конкретных вариантах осуществления костимулирующая молекула может обеспечивать оптимальную активацию лимфоцитов. Неограничивающие примеры костимулирующих молекул включают CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, DAP-10, CD27, CD40, NKGD2, CD2, FN14, HVEM, LTBR, CD28H, TNFR1, TNFR2, BAFF-R, BCMA, TACI, TROY, RANK, CD40, CD27, CD30, EDAR, XEDAR, GITR, DR6 и NGFR, а также их сочетания. Костимулирующая молекула может связывать костимулирующий лиганд, который представляет собой белок, экспрессируемый на клеточной поверхности, который при связывании с его рецептором продуцирует костимулирующий ответ, то есть, внутриклеточный ответ, который осуществляет стимуляцию, возникающую, когда антиген-узнающий рецептор (например, химерный антигенный рецептор (CAR)) связывает его целевой антиген. В качестве примера, лиганд 4-1BB (то есть, 4-1BBL) может связываться с 4-1BB, обеспечивая внутриклеточный сигнал, который в сочетании с сигналом CAR индуцирует эффекторную клеточную функцию CAR⁺ Т-клетки.

В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид CD28, например, внутриклеточный домен CD28 или его фрагмент. Полипептид CD28 может содержать или иметь аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%, по меньшей мере приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 66, или ее фрагменту, и/или может, необязательно, иметь от одной до двух или до трех консервативных аминокислотных замен. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывный фрагмент SEQ ID NO: 66, имеющий длину по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50 и до 220 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в различных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из последовательности аминокислот 1-220, 1-50, 50-100, 100-150, 114-220, 150-200, 180-220 или 200-220 в SEQ ID NO: 66. В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из последовательности аминокислот 180-220 в SEQ ID NO: 66.

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты 180-220 в SEQ ID NO: 66, приведена в SEQ ID NO: 70, которая представлена ниже.

```
AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAACATGACTCCCC
GCCGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCSTATGCCCCACCACGCGACTTCG
CAGCSTATCGCTCC [SEQ ID NO: 70]
```

В конкретных вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из

аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%, по меньшей мере приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 68, или ее фрагменту, и/или может, необязательно, иметь от одной до двух или до трех консервативных аминокислотных замен. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывный фрагмент SEQ ID NO: 68, имеющий длину по меньшей мере приблизительно 20 или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50 и до 218 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в различных неограничивающих вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из последовательности аминокислот 1-218, 1-50, 50-100, 100-150, 150-218, 178-218 или 200-218 в SEQ ID NO: 68. В конкретных вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область описанного в настоящем описании CAR содержит полипептид CD28, который содержит или состоит из аминокислот 178-218 в SEQ ID NO: 68.

В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид 4-1BB, например, внутриклеточный домен 4-1BB или его фрагмент. Полипептид 4-1BB может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%, по меньшей мере приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей регистрационный № NCBI: NP_001552 (SEQ ID NO: 71), или ее фрагменту, и/или может, необязательно, иметь от одной до двух или до трех консервативных аминокислотных замен. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления полипептид 4-1BB содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывный фрагмент SEQ ID NO: 71, имеющий длину по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50, или по меньшей мере 100, или по меньшей мере 150, или по меньшей мере 150 и до 255 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в различных неограничивающих вариантах осуществления полипептид 4-1BB содержит или состоит из последовательности аминокислот 1-255, 1-50, 50-100, 100-150, 150-200 или 200-255 в SEQ ID NO: 71. В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид 4-

1BB, содержащий или состоящий из последовательности аминокислот 214-255 в SEQ ID NO: 71. SEQ ID NO: 71 приведена ниже.

1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP
NSFSSAGGQR

61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ
ELTKKGCKDC

121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS
SVTPPAPARE

181 PGHSPQISF FLALTSTALL FLLFFLTRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR
PVQTTQEEDG

241 CSCRFPEEEE GGCEL [SEQ ID NO: 71]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты 214-255 в SEQ ID NO: 71, приведена в SEQ ID NO: 72, которая представлена ниже.

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
CAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA
GAAGGAGGATGTGAACTG [SEQ ID NO: 72]

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

5.3.2.4. Иллюстративные CAR

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим

образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.B10L3H_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
 QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLF
 MGSGEGRGSLT CGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHADIVMTQSPDSLAVSLGERA
 TINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF
 LTISSLQAEDVAVYYCQQYTSEPITFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG
 GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKG
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYS GMDVWGQGT TTVTSSE
 QKLISEEDLAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWLVVVGG
 VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEG
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
 [SEQ ID NO: 73]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, приведена в SEQ ID NO: 74, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT
 CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACAACCTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGG
 CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT TAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
 CTGGACCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
 GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
 AAATCATAACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
 TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
 ATAATTT CAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
 GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
 GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
 CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTTGGCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
 GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGT GAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
 GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
 CGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
 AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
 AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGG

GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
 GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
 GGGTTCCGGTGAGGGACGGGGGTCCTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
 CCGGTCCCATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCA
 TGCAGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCG
 TGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAGCTATAACAATGAGA
 ACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACT
 GGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTGAGTGGCAGCGGGTCTGGG
 ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTAC
 TGTCAGCAATATAACCAGCGAACCTATCACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAAT
 CAAAGGCGGGGGTGGTAGTGGCGGTGGAGGTAGCGGAGGTGGCGGGTCTGAGGTG
 CAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCC
 TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTCAGGGTGGCGGTGGTAGCACATA
 TTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCCTGACAATTCCAAGAACAC
 GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC
 GAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGGA
 CCACGGTCACCGTCTCCTCAGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGGCGGCC
 GCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACC
 ATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCT
 AAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTA
 GTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC
 AGTACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCA
 GCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAG
 GAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA
 ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT
 GAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC
 TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
 CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG
 ACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 74]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33; (b) трансмембранный домен,

содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (с) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид 4-1BB (например, внутриклеточный домен 4-1BB человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.B10L4H_MT_hBBZ». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
 QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLF
 MGSGEGRGSL TCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHADIVMTQSPDSLAVSLGERA
 TINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF
 LTISLQAEDVAVYYCQQYTSEPIFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGSGGGGSEVQLL
 ESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADS
 VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYS GMDVWGQTTVT
 VSSEQKLISEEDLAAAEVMPYPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVV
 VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG
 CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNP
 QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP
 R [SEQ ID NO: 75]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, приведена в SEQ ID NO: 76, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT
 CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGG
 CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT TAGGGGTGACTCCTTACACATACTCCTCCT
 CTGGACCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
 GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
 AAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
 TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
 ATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
 GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT

GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGA ACTCTGAGT
GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
CGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCACTGCGTC
AAGACCTGCCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
GGGTTCGGTGAGGGACGGGGGTC ACTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
CCGGTCCCATGGCTCTCCAGTGA CTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCA
TGCAGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCG
TGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGT TTTAGACAGCTATAACAATGAGA
ACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACT
GGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATT CAGTGGCAGCGGGTCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTAC
TGTCAGCAATATAACCAGCGAACCTATCACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAAT
CAAAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGT TCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTG
GATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTCAGGGTGGCGG
TGGTAGCACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCGAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCT
GGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGAACAGAACTGATCTCTGAAGAA
GACCTGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAG
AGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTT
CCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGT TGGTGGAGTCTGGCTTGC
TATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAG
AACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG
GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAG
AGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGC
TCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGA
CGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAG
GCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGG
ATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAG
TACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTA
G [SEQ ID NO: 76]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (а)

внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.B10L4H_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 77, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV
ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGL F
MGSGEGRGSL TCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHADIVMTQSPDSLAVSLGERA
TINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF T
LTISSLQAEDVAVYYCQQYTSEPITFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLL
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDY YSGMDVWGQTTVT
VSSEQKLISEEDLAA AIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFVVLV V
VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA
YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R [SEQ ID NO: 77]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, приведена в SEQ ID NO: 78, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT
CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC

ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGG
CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
CTGGACCCACAGGAAGTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
AAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
ATAATTTTCAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGTAGCCAAGGGAGTTTTGTGGAGAACTCTGAGT
GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
CGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
AAGACCTGCCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
GGGTCCGGTGAGGGACGGGGGTCACTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
CCGGTCCCATGGCTCTCCAGTGAAGTGCCTACTGCTTCCCCTAGCGTTCTCCTGCA
TGCAGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCG
TGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAGCTATAACAATGAGA
ACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACT
GGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTAGTGGCAGCGGGTCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTAC
TGTCAGCAATATAACCAGCGAACCTATCACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAAT
CAAAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTG
GATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTCAGGGTGGCGG
TGGTAGCACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCGAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCT
GGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGAACAGAACTGATCTCTGAAGAA
GACCTGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAG
AGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTT
CCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGC
TATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC
AGGCTCCTGCACAGTGAATGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGC
AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTG
AAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTA

TAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG
 GCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT
 GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA
 AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA
 GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG
 [SEQ ID NO: 78]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.B10H3L_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 79, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
 QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLF
 MGSGEGRGSL TCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAEVQLLES GGGLVQPGGSLR
 LSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYS GMDVWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGS
 GGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQKPGQP P KLLI
 YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYTSEPITFGQGTKVEIKE
 QKLISEEDLAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGG
 VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 [SEQ ID NO: 79]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, приведена в SEQ ID NO: 80, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACACACCCAGCATT
 CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGG
 CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
 CTGGACCCACAGGAAGTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
 GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
 AAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
 TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
 ATAATTTTCAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
 GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAATTTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
 GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
 CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
 GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
 GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
 CGGGGACCAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
 AAGACCTGCCCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
 AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
 GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
 GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
 GGGTCCGGTGAGGGACGGGGGTCAGTGTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
 CCGTCCCATGGCTCTCCAGTACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGTTCTCCTGCA
 TGCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
 TCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGGG
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTCAGGGTGGCGGT
 GGTAGCACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAAT
 TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGT
 GTATTACTGTGCGAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCTG
 GGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGGGGTGGTAGTGGCGGTGGAG
 GTAGCGGAGGTGGCGGGTCTGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTG
 TGTCTCTGGGCGAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACA
 GCTATAACAATGAGAACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCT
 AAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCACT
 GGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGA
 TGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATACCAGCGAACCTATCACGTTCCGGCCAAGG

TACCAAGGTGGAAATCAAAGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGGCGGCCG
 CAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCA
 TTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTA
 AGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG
 TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACA
 GTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAG
 CCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGG
 AGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA
 TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTG
 AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT
 GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGC
 CGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
 CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 80]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.B10H4L_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
 QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLF

MGSGEGRGSLTTCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAEVQLLESGGGLVQPGGSLR
 LSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYSMDVWGQTTVTVSSGGGGSGGGGS
 GGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQKPGQP
 PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYTSEPITFGQGTK
 VEIKEQKLISEEDLAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLV
 VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA
 AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 PR [SEQ ID NO: 81]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, приведена в SEQ ID NO: 82, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACACACCCAGCATT
 CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACAACCTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGG
 CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
 CTGGACCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
 GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
 AAATCATAACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
 TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
 ATAATTTTCAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
 GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
 GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
 CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
 GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGGAGCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
 GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
 CGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
 AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
 AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
 GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
 GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
 GGGTTCCGGTGAGGGACGGGGGTCACTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
 CCGTCCCATGGCTCTCCAGTGAAGTGCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCA
 TGCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
 TGCAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGGG
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTACAGGTGGCGGT
 GGTAGCACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAAT
 TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGT
 GTATTACTGTGCGAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCTG

GGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTG
 GTTCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAG
 ACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGA
 GTGTTTTAGACAGCTATAACAATGAGAACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCA
 GGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCT
 GACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG
 CAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAACCAGCGAACCTATCACG
 TTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATCAAAGAACAGAAACTGATCTCTGAAGAAGA
 CCTGGCGGCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAG
 CAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCC
 CGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTA
 TAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAG
 GCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAA
 GCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAA
 GTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA
 ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
 CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT
 ACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAA
 AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG
 CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ
 ID NO: 82]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.C3H3L_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит

аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
 QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLF
 MGSGEGRGSLT CGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAEVQLLES GGGGLVQP GGS LR
 LSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIDGSGGGTNYADSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYYDILTGYPVDGMDVWGQGT TTVTVSSGGGGSGGG
 GSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSYNNENNLAWYQQKPGQP PKL
 LIYAASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSEPYTFGQGTKVEI
 KEQKLISEEDLAA AIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWLVVV
 GGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL LHS DYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAY
 RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQ
 EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
 [SEQ ID NO: 83]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, приведена в SEQ ID NO: 84, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT
 CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAA ACTGCACCTCCATCAGTGG
 CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT TAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
 CTGGACCCACAGGA ACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
 GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
 AAATCATAACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
 TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
 ATAATTT CAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
 GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
 GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
 CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
 GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
 GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
 CGGGGACCAGACA ACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
 AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
 AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
 GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
 GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT

GGGTTCCGGTGAGGGACGGGGGTCCTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
 CCGGTCCCATGGCTCTCCCAGTGAAGTCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCA
 TGCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
 TCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTACCAGCTATGCCATGAGCTGGG
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTGACGGTAGCGGT
 GGTGGCACAAATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCCTGACAA
 TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTG
 TGTATTACTGTGCGAGAGCGTATTACGATAATTTGACTGGTTACCCCGTGGACGGTA
 TGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCTCAGGCGGGGGTGGTAGT
 GGCGGTGGAGGTAGCGGAGGTGGCGGGTCTGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGA
 CTCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAG
 TGTTTTAAGCAGCTATAACAATGAGAACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAG
 GACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGCCGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTG
 ACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGC
 AGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCGAACCTTATACGT
 TCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATCAAAGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGAC
 CTGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGC
 AATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCC
 GGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTAT
 AGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGG
 CTCCTGCACAGTGAAGTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAG
 CATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAG
 TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAA
 CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCC
 GGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTA
 CAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA
 GGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGC
 CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ
 ID NO: 84]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его

фрагмент), и (с) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.C3L3H_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
 QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLF
 MGSGEGRGSLTTCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHADIVMTQSPDSLAVSLGERA
 TINCKSSQSVLSSYNNENNLAWYQQKPGQPPKLLIYAASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL
 TISSLQAEDVAVYYCQQYYSEPYTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG
 GLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIDGSGGGTNYADSVKG
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYYDILTGYPVDGMDVWGQTTVTV
 SSEQKLISEEDLAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVV
 GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLSHYDYMNTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAAY
 RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQ
 EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
 [SEQ ID NO: 85]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, приведена в SEQ ID NO: 86, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT
 CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACAACCTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGG
 CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT TAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
 CTGGACCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
 GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
 AAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
 TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
 ATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
 GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
 GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGC

CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
 GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
 GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
 CGGGGACCAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
 AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
 AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
 GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCCTCCATCGCCACTGG
 GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
 GGGTTCCGGTGAGGGACGGGGGTCACTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
 CCGGTCCCATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCA
 TGCAGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCG
 TGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAAGCAGCTATAACAATGAGA
 ACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACG
 CCGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGG
 ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTAC
 TGTCAGCAATATTATAGCGAACCTTATACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATC
 AAAGGCGGGGGTGGTAGTGGCGGTGGAGGTAGCGGAGGTGGCGGGTCTGAGGTGC
 AGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCT
 GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTACCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTC
 CAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTGACGGTAGCGGTGGTGGCACAAAT
 TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCCTGACAATTCCAAGAACAC
 GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC
 GAGAGCGTATTACGATATTTTGACTGGTTACCCCGTGGACGGTATGGACGTCTGGGG
 CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACC
 TGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCA
 ATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCG
 GACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA
 GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGC
 TCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGC
 ATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGT
 TCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC
 GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG
 GGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTAC
 AATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAG
 GCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC
 ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ ID
 NO: 86]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-
 нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a)
 внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1,

содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_L - V_H . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.D6L3H_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
QHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV
ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLF
MGSGEGRGSLTTCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHADIVMTQSPDSLAVSLGERA
TINCKSSQSVLRSSNNKNNLAWYQQKPGQPPKLLIYAASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL
TISSLQAEDVAVYYCQYYREPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG
GLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIDGSGGSTDYADSVKG
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALELGATTVYWGQGT LVTVSSEQKLISEE
DLAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFV L VVVGGV LACYS
LLVTVAFIIFWVR SKRSRL LHS DYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSR
SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR [SEQ ID
NO: 87]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, приведена в SEQ ID NO: 88, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT
CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACAACCTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGG

CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
CTGGACCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
AAATCATAACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
ATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
CGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTTTCAT
GGGTCCGGTGAGGGACGGGGGTCACTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
CCGGTCCCATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGTTCTCCTGCA
TGCAGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCG
TGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTACGCAGCAGCAACAATAAAA
ACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACG
CCGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTAGTGGCAGCGGGTCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTAC
TGTCAGCAATATTATCGCGAACCTCTGACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATC
AAAGGCGGGGGTGGTAGTGGCGGTGGAGGTAGCGGAGGTGGCGGGTCTGAGGTGC
AGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTACCGACTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTC
CAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGACATTGACGGTAGCGGTGGTAGCACAGAC
TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTGTACTACTGTGC
GCTAGAGCTGGGAGCTACTACCGTCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC
CTCAGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGT
ATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAG
GGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCT
GGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGTATAGCTTGTAGTAACAGTGGCCTTTAT
TATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACA
TGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCAC
GCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC
GCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGA
GGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGC

CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
 GGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG
 CACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTT
 CACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 88]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 93. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.B10H1L_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 95, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
 QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLF
 MGSGEGRGSL TCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAEVQLLES GGLVQP GGLSLR
 LSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYS GMDVWGQGT VTVSSGGGGSDIVMTQ
 SPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP
 DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY TSEPITFGQGTKVEIKEQKLISEEDLAAA
 IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVA
 FIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA
 YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
 EAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 95]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, приведена в SEQ ID NO: 96, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACACACCCAGCATT
CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACAACCTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGG
CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGGTACTCCTTACACATACTCCTCCT
CTGGACCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
AAATCATAACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
ATAATTTTCAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAA
GTTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTTGGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
CGGGGACCAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
GGGTCCGGTGAGGGACGGGGGTCACTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
CCGGTCCCATGGCTCTCCAGTGAAGTGCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCA
TGCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
TGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTCAGGGTGGCGGT
GGTAGCACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAAT
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCGAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCTG
GGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGGGGTGGTAGTGACATCGTGA
TGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCGTGCCACCATCAACT
GCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAGCTATAACAATGAGAACAATTTAGCTTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGG
AATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAACCA
GCGAACCTATCACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATCAAAGAACAGAAACTG
ATCTCTGAAGAAGACCTGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTA
GACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCC
AAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGG

AGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGG
 AGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAACATGACTCCCCGCCGCC
 CGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTA
 TCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC
 AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
 GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
 GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
 AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
 CCCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 96]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 94. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.B10H2L_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 97, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
 QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGL F
 MGSGEGRGSL TCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAEVQLLES GGLVQP GGLR
 LSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYS GMDVWVGQTTVTVSSGGGGSGGGGS

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYTSEPITFGQGTKVEIKEQKLISE
 EDLAAAEVMPYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACY
 SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFS
 RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR [SEQ ID
 NO: 97]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, приведена в SEQ ID NO: 98, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT
 CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGG
 CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
 CTGGACCCACAGGAAGTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
 GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
 AAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
 TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
 ATAATTTTCAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
 GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
 GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
 CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
 GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
 GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
 CGGGGACCAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
 AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
 AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
 GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
 GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
 GGGTTCGGTGAGGGACGGGGTCACTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
 CCGTCCCATGGCTCTCCAGTGAAGTGCCTACTGCTTCCCCTAGCGTTCTCCTGCA
 TGCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
 TCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGGG
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTCAGGGTGGCGGT
 GGTAGCACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAAT
 TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGT
 GTATTACTGTGCGAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCTG
 GGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGGGGTGGTAGTGGAGGTGGCG
 GGTCTGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGC
 GTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAGCTATAACAATGAG

AACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTAC
 TGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGG
 GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTA
 CTGTCAGCAATATAACCAGCGAACCTATCACGTTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAA
 TCAAAGAACAGAAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGGCGGCCGCAATTGAAGTTATG
 TATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAA
 GGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGC
 TGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTA
 TTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAAC
 ATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCA
 CGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC
 CGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAG
 AGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAA
 GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG
 ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGG
 GGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCC
 CTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 98]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 91. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.B10H5L_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 99, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK

QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLF
 MGSGEGRGSLTTCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAEVQLLES GGGGLVQPGGSLR
 LSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYS GMDVWGQTTVTVSSGGGGSGGGGS
 GGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQ
 KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYTSEPIFG
 QGTKVEIKEQKLISEEDLAAAEVMPYPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPF
 WVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP
 PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGK
 PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALH
 MQALPPR [SEQ ID NO: 99]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, приведена в SEQ ID NO: 100, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT
 CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAA ACTGCACCTCCATCAGTGG
 CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT TAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
 CTGGACCCACAGGA ACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
 GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
 AAATCATAACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
 TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
 ATAATTT CAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
 GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAA AATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
 GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
 CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
 GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
 GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
 CGGGGACCAGACA ACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC
 AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
 AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
 GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
 GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
 GGGTTCCGGTGAGGGACGGGGGTCACTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
 CCGGTCCCATGGCTCTCCAGTGA CTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCA
 TGCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
 TCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGGG

TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTCAGGGTGGCGGT
 GGTAGCACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAAT
 TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGT
 GTATTACTGTGCGAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCTG
 GGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTG
 GTTCTGGAGGGGGCGGTTCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATCGTG
 ATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCGTGCCACCATCAAC
 TGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAGCTATAACAATGAGAACAATTTAGCTTGG
 TATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGG
 GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTC
 ACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAACC
 AGCGAACCTATCACGTTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAATCAAAGAACAGAACT
 GATCTCTGAAGAAGACCTGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCT
 AGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTC
 CAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGG
 AGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGG
 AGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAACATGACTCCCCGCCGCC
 CGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTA
 TCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC
 AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
 GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
 GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
 AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
 CCCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 100]

В конкретных вариантах осуществления CAR представляет собой CD371-нацеленный CAR. В конкретных вариантах осуществления CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33; (b) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (c) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L связаны линкером, содержащим или состоящим из аминокислотной

последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 92. В конкретных вариантах осуществления V_H и V_L расположены в направлении от N-конца к C-концу следующим образом: V_H - V_L . В конкретных вариантах осуществления CAR имеет обозначение «Et.B10H6L_MT_h28Z». В конкретных вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 101, которая представлена ниже.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL
 HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK
 QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS
 NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFV
 ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVW
 KYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLF
 MGSGEGRGSLT CGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAEVQLLES GGGGLVQPGGSLR
 LSCAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYYS GMDVWGQTTVTVSSGGGGSGGGGS
 GGGGSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNL
 AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLT ISSLQAEDVA VYYCQQYT
 SEPITFGQGTKVEIKEQKLISEEDLAA AIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFP
 GPSKPFWVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWVRSKR S RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
 YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
 EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
 YDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 101]

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, приведена в SEQ ID NO: 102, которая представлена ниже.

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATT
 CCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTC
 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACA CT TCAAAA ACTGCACCTCCATCAGTGG
 CGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT TAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCT
 CTGGACCCACAGGA ACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT
 GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAG
 AAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
 TGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTG
 ATAATTT CAGGAAACAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACT
 GTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT
 GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
 CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGT
 GGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGT
 GCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGA
 CGGGGACCAGACA ACTGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTC

AAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGC
 AGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGG
 GCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGG
 GATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCAT
 GGGTTCCGGTGAGGGACGGGGGTCCTGCTCACCTGCGGAGATGTAGAAGAGAATC
 CCGGTCCCATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCA
 TGCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
 TGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGGG
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGGCATTCAGGGTGGCGGT
 GGTAGCACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAAT
 TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGT
 GTATTACTGTGCGAGAGAGATGTGGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCTG
 GGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTG
 GTTCTGGTGGGGGCGGTAGTGGAGGGGGCGGTTCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGT
 GGATCCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAG
 CGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAGCTATAACAATGA
 GAACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTA
 CTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTG
 GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATT
 ACTGTCAGCAATATAACCAGCGAACCTATCACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAA
 ATCAAAGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGGCGGCCGCAATTGAAGTTAT
 GTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAA
 AGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGT
 GCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTT
 TATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGA
 ACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCAC
 CACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC
 CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG
 AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGA
 AAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATA
 AGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA
 GGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACG
 CCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 102]

В конкретных вариантах осуществления описанный в настоящем описании CAR дополнительно содержит индуцируемый промотор для экспрессии нуклеотидных последовательностей в человеческих клетках. Промотор, используемый в экспрессируемых генах CAR, может представлять собой конститутивный промотор, такой как промотор убиквитина С (UbiC).

5.3.3. TCR-подобные слитые молекулы

В конкретных вариантах осуществления антиген-узнающий рецептор представляет

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

В конкретных вариантах осуществления TCR-подобная слитая молекула содержит антигенсвязывающую цепь, которая содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и константный домен, при этом TCR-подобная слитая молекула связывает антиген независимо от HLA образом. В конкретных вариантах осуществления константный домен содержит константную область Т-клеточного рецептора, выбранную из группы, состоящей из природного или модифицированного пептида TRAC, природного или модифицированного пептида TRBC, природного или модифицированного пептида TRDC, природного или модифицированного пептида TRGC, а также любых их вариантов или функциональных фрагментов. В конкретных вариантах осуществления константный домен содержит природный или модифицированный пептид TRAC. В конкретных вариантах осуществления константный домен содержит природный или модифицированный пептид TRBC. В конкретных вариантах осуществления константный домен способен к образованию гомодимера или гетеродимера с другим константным доменом. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающая цепь способна к связыванию с полипептидом CD3 ζ . В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающая цепь после связывания антигена способна к активации полипептида CD3 ζ , связанного с антигенсвязывающей цепью. В конкретных вариантах осуществления активация полипептида CD3 ζ способна приводить к активации иммунореактивной клетки. В конкретных вариантах осуществления TCR-подобная слитая молекула способна к интеграции с комплексом CD3 и обеспечению HLA-независимого узнавания антигена. В конкретных вариантах осуществления TCR-подобная слитая молекула заменяет эндогенный TCR в комплексе CD3/TCR. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы способен к димеризации с другим внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит лиганд для клеточного поверхностного рецептора, рецептор для клеточного поверхностного лиганда, антигенсвязывающий фрагмент антитела или его фрагмента, или антигенсвязывающий фрагмент TCR. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит одну или две переменные области иммуноглобулина. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной

слитой молекулы содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H) антитела. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит вариабельную область легкой цепи (V_L) антитела. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы способен к димеризации с другим внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит V_H антитела, где V_H способна к димеризации с другим внеклеточным антигенсвязывающим доменом, содержащим V_L антитела, и к образованию вариабельного фрагмента (Fv). В конкретных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит V_L антитела, где V_L способна к димеризации с другим внеклеточным антигенсвязывающим доменом, содержащим V_H антитела, и к образованию вариабельного фрагмента (Fv).

TCR-подобная слитая молекула может связывать опухолевый антиген или антиген патогена. В конкретных вариантах осуществления TCR-подобная слитая молекула связывает опухолевый антиген.

5.4. Клетки

Описанное в настоящем описании изобретение относится к клеткам, содержащим описанный в настоящем описании CD371-нацеленный антиген-узнающий рецептор (например, тот, который описан в разделе 5.3). В конкретных вариантах осуществления клетка выбрана из группы, состоящей из клеток лимфоидной линии дифференцировки и клеток миелоидной линии дифференцировки. В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой иммунореактивную клетку. В конкретных вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет собой клетку лимфоидной линии дифференцировки.

В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку лимфоидной линии дифференцировки. Клетки лимфоидной линии дифференцировки могут обеспечивать продуцирование антител, регуляцию клеточной иммунной системы, обнаружение инородных агентов в крови, обнаружение клеток, инородных для хозяина, и тому подобное. Неограничивающие примеры клеток лимфоидной линии дифференцировки включают Т-клетки, клетки - естественные киллеры (NK), В-клетки, дендритные клетки, стволовые клетки, из которых могут дифференцироваться лимфоидные клетки. В конкретных вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (например, эмбриональную стволовую клетку).

В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. Т-клетки могут представлять собой лимфоциты, которые созревают в тимусе и отвечают главным образом за опосредованный клетками иммунитет. Т-клетки вовлечены в адаптивную иммунную систему. Т-клетки по описанному в настоящем описании изобретению могут представлять собой Т-клетки любого типа, включая, но без ограничения, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти (включая

центральные Т-клетки памяти, подобные стволовым клеткам Т-клетки памяти (или Т-клетки, аналогичные стволовым клеткам) и эффекторные Т-клетки памяти двух видов: например, ТЕМ-клетки и ТЕМРА-клетки, регуляторные Т-клетки (также известные как супрессорные Т-клетки), опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ), Т-клетки - естественные киллеры, связанные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки. Цитотоксические Т-клетки (CTL или Т-клетки - киллеры) представляют собой подмножество Т-лимфоцитов, способных вызывать гибель инфицированных соматических или опухолевых клеток. Собственные Т-клетки пациента могут быть генетически модифицированы для нацеливания на конкретные антигены за счет введения антиген-узнающего рецептора, например, CAR или TCR. В конкретных вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет собой Т-клетку. Т-клетка может представлять собой $CD4^+$ Т-клетку или $CD8^+$ Т-клетку. В конкретных вариантах осуществления Т-клетка представляет собой $CD4^+$ Т-клетку. В конкретных вариантах осуществления Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой НК-клетку. Клетки - естественные киллеры (НК) могут представлять собой лимфоциты, которые участвуют в опосредованном клетками иммунитете и действуют в процессе врожденного иммунного ответа. Для НК-клеток не нужна предварительная активация для оказания их цитотоксического эффекта на клетки-мишени.

Типы человеческих лимфоцитов по описанному в настоящем описании изобретению включают, без ограничения, периферические донорские лимфоциты. Например, те, которые описаны в публикации Sadelain *et al.*, *Nat Rev Cancer* (2003); 3:35-45 (в которой описаны периферические донорские лимфоциты, генетически модифицированные для экспрессии CAR), в публикации Morgan, R.A., *et al.* 2006 *Science* 314:126-129 (в которой описаны периферические донорские лимфоциты, генетически модифицированные для экспрессии полноразмерного узнающего опухолевый антиген Т-клеточного рецепторного комплекса, содержащего гетеродимер α и β), в публикациях Panelli *et al.*, *J Immunol* (2000);164:495-504; Panelli *et al.*, *J Immunol* (2000);164:4382-4392 (в которых описаны культуры лимфоцитов, полученные из опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в образцах биопсии опухоли), и в публикациях Dupont *et al.*, *Cancer Res* (2005);65:5417-5427; Papanicolaou *et al.*, *Blood* (2003);102:2498-2505 (в которых описаны антиген-специфические лейкоциты периферической крови, избирательно *in vitro* размноженные с использованием искусственных антигенпредставляющих клеток (ААРС) или импульсных дендритных клеток).

Клетки (например, Т-клетки) могут быть аутологичными, не аутологичными (например, аллогенными) или полученными *in vitro* из генетически модифицированных предшественников или стволовых клеток.

Клетки по описанному в настоящем описании изобретению могут представлять собой клетки миелоидной линии дифференцировки. Неограничивающие примеры клеток миелоидной линии дифференцировки включают моноциты, макрофаги, нейтрофилы,

дендритные клетки, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, мегакариоциты, тучные клетки, эритроциты, тромбоциты, а также стволовые клетки, из которых могут дифференцироваться миелоидные клетки. В конкретных вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (например, эмбриональную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку).

В конкретных вариантах осуществления описанные в настоящем описании клетки способны модулировать микросреду опухоли. Опухоли имеют микросреду, которая подавляет иммунный ответ хозяина, при этом раковые клетки используют различные механизмы для своей защиты от узнавания и уничтожения иммунной системой. Эта «враждебная микросреда опухоли» содержит множество иммуносупрессорных факторов, включая инфильтрирующие регуляторные CD4⁺ Т-клетки (T_{reg}), миелоидные клетки-супрессоры (MDSC), опухоль-ассоциированные макрофаги (TAM), иммуносупрессорные цитокины, включая TGFβ, и экспрессированные лиганды, нацеленные на иммуносупрессорные рецепторы, экспрессируемые активированными Т-клетками (CTLA-4 и PD-1). Эти механизмы иммунной супрессии играют определенную роль в поддержании толерантности и подавлении неуместных иммунных ответов, однако в микросреде опухоли эти механизмы предотвращают эффективный противоопухолевый иммунный ответ. В совокупности эти иммуносупрессорные факторы могут вызывать либо выраженную анергию, либо апоптоз адоптивно перенесенных CAR-модифицированных Т-клеток при встрече с опухолевыми клетками-мишенями.

В конкретных вариантах осуществления клетки могут быть трансдуцированы описанным в настоящем описании CD371-нацеленным антиген-узнающим рецептором, в результате чего такие клетки экспрессируют антиген-узнающий рецептор.

В конкретных вариантах осуществления клетка также содержит растворимый одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который связывает полипептид, имеющий иммуносупрессорную активность или иммуностимулирующую активность. В конкретных вариантах осуществления «иммуносупрессорная активность» означает индукцию сигнальной трансдукции или изменения в белковой экспрессии в клетке (например, активированной иммунореактивной клетке), приводящие к ослаблению иммунного ответа. Полипептиды, которые, как известно, подавляют или снижают иммунный ответ при их связывании, включают CD47, PD-1, CTLA-4 и их соответствующие лиганды, в том числе SIRPα, PD-L1, PD-L2, B7-1 и B7-2. Такие полипептиды присутствуют в микросреде опухоли и ингибируют иммунные ответы на неопластические клетки. В различных вариантах осуществления ингибирование, блокирование или создание препятствия для взаимодействия иммуносупрессорных полипептидов и/или их лигандов приводит к усилению иммунного ответа иммунореактивных клеток.

В конкретных вариантах осуществления «иммуностимулирующая активность» означает индукцию сигнальной трансдукции или изменения в белковой экспрессии в клетке (например, активированной иммунореактивной клетке), приводящие к усилению

иммунного ответа. Иммуностимулирующая активность может включать провоспалительную активность. Полипептиды, которые, как известно, стимулируют или усиливают иммунный ответ при их связывании, включают CD28, OX-40, 4-1BB и их соответствующие лиганды, в том числе B7-1, B7-2, OX-40L и 4-1BBL. Такие полипептиды присутствуют в микросреде опухоли и активируют иммунные ответы на неопластические клетки. В различных вариантах осуществления способствованию, стимуляция или оказание содействия для провоспалительных полипептидов и/или их лигандов приводит к усилению иммунного ответа иммунореактивных клеток.

Клетки, содержащие антиген-узнающий рецептор (например, CAR) и растворимый scFv, который связывает полипептид, имеющий иммуносупрессорную активность или иммуностимулирующую активность, описаны в международной публикации патента № WO 2014/134165, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

В конкретных вариантах осуществления клетка также содержит экзогенный CD40L. Клетки, содержащие антиген-узнающий рецептор (например, CAR) и экзогенный CD40L, описаны в международной публикации патента № WO 2014/134165.

Кроме того, в конкретных вариантах осуществления клетка генетически модифицирована для экспрессии IL-18. В конкретных вариантах осуществления клетка также содержит экзогенный полипептид IL-18. В конкретных вариантах осуществления экзогенный полипептид IL-18 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 103, которая представлена ниже.

MGYRMQLLSICIALSLALVTNSGYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDM
TDSDCRДНKPRTIFISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT
KSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQN
ED [SEQ ID NO: 103]

В конкретных вариантах осуществления клетки также содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-18. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 104, которая представлена ниже.

ATGGGTTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGT
CACAAACAGTGGCTACTTTGGCAAGCTTGAATCTAAATTATCAGTCATAAGAAATTT
GAATGACCAAGTTCTCTTCATTGACCAAGGAAATCGGCCTCTATTTGAAGATATGAC
TGATTCTGACTGTAGAGATAATGCACCCCGGACCATATTTATTATAAGTATGTATAA
AGATAGCCAGCCTAGAGGTATGGCTGTAACSTATCTCTGTGAAGTGTGAGAAAATTT
AACTCTCTCCTGTGAGAACAATAATTTTCTTTAAGGAAATGAATCCTCCTGATAA
CATCAAGGATACAAAAAGTGACATCATATTTCTTTTCAGAGAAGTGTCCCAGGACATG
ATAATAAGATGCAATTTGAATCTTCATCATACGAAGGATACTTTCTAGCTTGTGAAA
AAGAGAGAGACSTTTTAACTCATTTTGAAAAAAGAGGATGAATTGGGGGATAGA
TCTATAATGTTCACTGTTCAAAACGAAGACTAG [SEQ ID NO: 104]

Альтернативно, в конкретных вариантах осуществления клетка также содержит

модифицированный промотор/энхансер в локусе гена IL-18, который может повышать экспрессию гена IL-18, например, конститутивный или индуцируемый промотор размещен для управления экспрессией гена IL-18.

Клетки, содержащие антиген-узнающий рецептор (например, CAR) и генетически модифицированные для экспрессии IL-18, например, содержащие экзогенный полипептид IL-18 или модифицированный промотор/энхансер в локусе гена IL-18, описаны в международной публикации патента № WO2018/027155, полное содержание которой включено посредством ссылки.

Дополнительно или альтернативно, клетка генетически модифицирована для экспрессии IL-33. В конкретных вариантах осуществления клетка также содержит экзогенный полипептид IL-33. В конкретных вариантах осуществления экзогенный полипептид IL-33 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 105, которая представлена ниже.

MYRMQLLSICIALSLALVTNSSITGISPITEYLAASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVED
LKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNESGDGVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELH
KCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLCTENILFK
LSET [SEQ ID NO: 105]

В конкретных вариантах осуществления клетка также содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид IL-33. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 106, которая представлена ниже.

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGTCAC
AAACAGTAGTATCACAGGAATTTACCTATTACAGAGTATCTTGCTTCTCTAAGCAC
ATACAATGATCAATCCATTACTTTTGGCTTTGGAGGATGAAAGTTATGAGATATATGT
TGAAGACTTGAAAAAAGATGAAAAGAAAGATAAGGTGTTACTGAGTTACTATGAGT
CTCAACACCCCTCAAATGAATCAGGTGACGGTGTGATGGTAAGATGTTAATGGTAA
CCCTGAGTCCTACAAAAGACTTCTGGTTGCATGCCAACAACAAGGAACACTCTGTGG
AGCTCCATAAGTGTGAAAAACCACTGCCAGACCAGGCCTTCTTTGTCCTTCATAATA
TGCACTCCAACCTGTGTTTCATTTGAATGCAAGACTGATCCTGGAGTGTTTATAGGTG
TAAAGGATAATCATCTTGCTCTGATTAAGTAGACTCTTCTGAGAATTTGTGTACTG
AAAATATCTTGTTTAAGCTCTCTGAAACTTAG [SEQ ID NO: 106]

Альтернативно, в конкретных вариантах осуществления клетка также содержит модифицированный промотор/энхансер в локусе гена IL-33, который может повышать экспрессию гена IL-33, например, конститутивный или индуцируемый промотор размещен для управления экспрессией гена IL-33. Клетки, содержащие антиген-узнающий рецептор (например, CAR) и генетически модифицированные для экспрессии IL-33, например, содержащие экзогенный полипептид IL-33 или модифицированный промотор/энхансер в локусе гена IL-33, описаны в международной публикации патента № WO2019/099479, полное содержание которой включено посредством ссылки.

Дополнительно или альтернативно, клетка генетически модифицирована для

экспрессии IL-36. В конкретных вариантах осуществления клетка также содержит экзогенный полипептид IL-36. В конкретных вариантах осуществления клетка также содержит модифицированный промотор/энхансер в локусе гена IL-36, который может повышать экспрессию гена IL-36, например, конститутивный или индуцируемый промотор размещен для управления экспрессией гена IL-36. Клетки, содержащие антиген-узнающий рецептор (например, CAR) и генетически модифицированные для экспрессии IL-36, например, содержащие экзогенный полипептид IL-36 или модифицированный промотор/энхансер в локусе гена IL-36, описаны в международной публикации патента № WO2019/099483, полное содержание которой включено посредством ссылки.

5.5. Композиции и векторы

Описанное в настоящем описании изобретение относится к композициям, содержащим описанный в настоящем описании CD371-нацеленный антиген-узнающий рецептор (например, тот, который описан в разделе 5.3). Также предложены клетки, содержащие такие композиции.

В конкретных вариантах осуществления описанный в настоящем описании CD371-нацеленный антиген-узнающий рецептор функционально связан с промотором.

Кроме того, описанное в настоящем описании изобретение относится к композициям нуклеиновой кислоты, содержащим полинуклеотид, кодирующий описанный в настоящем описании CD371-нацеленный антиген-узнающий рецептор (например, тот, который описан в разделе 5.3). Также предложены клетки, содержащие такие композиции нуклеиновой кислоты.

В конкретных вариантах осуществления композиция нуклеиновой кислоты также содержит промотор, функционально связанный с описанным в настоящем описании CD371-нацеленным антиген-узнающим рецептором.

В конкретных вариантах осуществления промотор является эндогенным или экзогенным. В конкретных вариантах осуществления экзогенный промотор выбран из промотора фактора элонгации (EF)-1, немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), раннего промотора обезьяньего вируса 40 (SV40), промотора фосфолицераткиназы (PGK) и промотора металлотронеина. В конкретных вариантах осуществления промотор представляет собой индуцируемый промотор. В конкретном варианте осуществления индуцируемый промотор выбран из промотора транскрипционного фактора NFAT (TRE), промотора CD69, промотора CD25 и промотора IL-2.

Композиции, и композиции нуклеиновой кислоты, можно вводить субъектам и/или доставлять в клетки известными в данной области способами, или как описано в настоящем описании. Генетическую модификацию клеток (например, Т-клеток или НК-клеток) можно осуществлять путем трансдукции практически гомогенной клеточной композиции рекомбинантной конструкцией ДНК. В конкретных вариантах осуществления используют ретровирусный вектор (например, гамма-ретровирусный вектор или лентивирусный вектор) для введения конструкции ДНК в клетку. Например, полинуклеотид, кодирующий антиген-узнающий рецептор, можно клонировать в ретровирусный вектор, и экспрессия

может происходить под контролем эндогенного промотор, с ретровирусного длинного концевой повтора или с промотора, специфического для клеток-мишеней интересующего типа. Также можно использовать невирусные векторы.

Для начальной генетической модификации клетки с целью включения CD371-нацеленного антиген-узнающего рецептора, описанного в настоящем описании (например, CAR или TCR), для трансдукции можно использовать ретровирусный вектор, однако можно использовать и любой другой подходящий вирусный вектор или невирусную систему доставки. Антиген-узнающий рецептор может быть сконструирован в одной мультицистронной экспрессионной кассете, в нескольких экспрессионных кассетах одного вектора или в нескольких векторах. Примеры элементов, из которых создают полицистронную экспрессионную кассету, включают, но не ограничиваются ими, различные вирусные и невирусные внутренние участки связывания рибосомы (IRES, например, IRES FGF-1, IRES FGF-2, IRES VEGF, IRES IGF-II, IRES NF-κB, IRES RUNX1, IRES p53, IRES вируса гепатита А, IRES вируса гепатита С, IRES пестивируса, IRES афтовируса, IRES пикорнавируса, IRES вируса полиомиелита и IRES вируса энцефаломиокардита) и расщепляемые линкеры (например, пептиды 2A, например, пептиды P2A, T2A, E2A и F2A). Также являются подходящими сочетания ретровирусного вектора и соответствующей линии клеток-упаковщиков, где капсидные белки будут функциональными для инфицирования человеческих клеток. Известны различные линии клеток, продуцирующих амфотропные вирусы, включая, но без ограничения, PA12 (Miller *et al.*, (1985) *Mol Cell Biol* (1985);5:431-437); PA317 (Miller., *et al.*, *Mol Cell Biol* (1986); 6:2895-2902) и CRIP (Danos *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1988);85:6460-6464). Не амфотропные вирусные частицы также являются подходящими, например, частицы, псевдотипированные с оболочкой VSVG, RD114 или GALV, а также любые другие, известные в данной области.

Возможные способы трансдукции также включают непосредственное совместное культивирование клеток с клетками-продуцентами (Bregni *et al.*, *Blood* (1992);80:1418-1422), либо культивирование с одним только вирусным супернатантом или концентрированными маточными растворами вектора с добавлением или без добавления соответствующих факторов роста и поликатионов (Xu *et al.*, *Exp Hemat* (1994); 22:223-230; и Hughes *et al.* *J Clin Invest* (1992); 89:1817).

Для модификации клетки могут быть использованы и другие трансдуцирующие вирусные векторы. В конкретных вариантах осуществления выбранный вектор проявляет высокую эффективность инфекции, а также стабильную интеграцию и экспрессию (смотри, например, Cayouette *et al.*, *Human Gene Therapy* 8:423-430, 1997; Kido *et al.*, *Current Eye Research* 15:833-844, 1996; Bloomer *et al.*, *Journal of Virology* 71:6641-6649, 1997; Naldini *et al.*, *Science* 272:263-267, 1996; и Miyoshi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10319, 1997). Другие вирусные векторы, которые могут быть использованы, включают, например, аденовирусные, лентивирусные и аденоассоциированные вирусные векторы, вирус осповакцины, вирус бычьей папилломы или вирус герпеса, например, вирус Эпштейна-

Барт (также смотри, например, векторы, описанные в публикациях Miller, *Human Gene Thera* (1990);15-14; Friedman, *Science* 244:1275-1281, 1989; Eglitis *et al.*, *BioTechniques* (1988);6:608-614; Tolstoshev *et al.*, *Cur Opin Biotechnol* (1990); 1:55-61; Sharp, *The Lancet* (1991);337:1277-78; Cornetta *et al.*, *Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311-22, 1987; Anderson, *Science* (1984);226:401-409; Moen, *Blood Cells* 17:407-16, 1991; Miller *et al.*, *Biotechnol* (1989);7:980-90; LeGal La Salle *et al.*, *Science* (1993);259:988-90; и Johnson, *Chest* (1995)107:77S-83S). Ретровирусные векторы особенно хорошо изучены, и их используют в клинических условиях (Rosenberg *et al.*, *N Engl J Med* (1990);323:370, 1990; Anderson *et al.*, патент США № 5399346).

Для генетической модификации клеток также можно использовать невирусные подходы. Например, молекулу нуклеиновой кислоты можно вводить в клетку методом липофекции (Feigner *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1987);84:7413; Ono *et al.*, *Neurosci Lett* (1990);17:259; Brigham *et al.*, *Am J Med Sci* (1989);298:278; Staubinger *et al.*, *Methods in Enzymol* (1983);101:512, Wu *et al.*, *J Biol Chem* (1988);263:14621; Wu *et al.*, *J Biol Chem* (1989);264:16985) или путем микроинъекции в хирургических условиях (Wolff *et al.*, *Science* (1990);247:1465). Другие способы невирусного переноса генов включают трансфекцию *in vitro* с использованием фосфата кальция, DEAE декстрана, электропорации и слияния протопластов. Липосомы также могут быть потенциально полезными для доставки ДНК в клетку. Трансплантацию нормальных генов в пораженные ткани субъекта также можно осуществлять путем переноса нормальной нуклеиновой кислоты в культивируемую клетку *ex vivo* (например, аутологичную или гетерологичную первичную клетку или ее потомство), после чего клетку (или ее потомство) вводят инъекцией в пораженную ткань или вводят инъекцией системно. Рекомбинантные рецепторы также могут быть созданы или получены с использованием транспозаз или направленных нуклеаз (например, нуклеаз «цинковые пальцы», мегануклеаз или нуклеаз TALE, CRISPR). Временная экспрессия может быть достигнута за счет введения РНК методом электропорации.

Также можно использовать любые способы направленного редактирования генома для доставки антиген-узнающего рецептора, описанного в настоящем описании, в клетку или в организм субъекта. В конкретных вариантах осуществления используют систему CRISPR для доставки антиген-узнающего рецептора, описанного в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления для доставки антиген-узнающего рецептора используют нуклеазы «цинковые пальцы». В конкретных вариантах осуществления для доставки антиген-узнающего рецептора, описанного в настоящем описании, используют систему TALEN.

Система коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), представляет собой инструмент редактирования генома, обнаруженный в прокариотических клетках. При использовании для редактирования генома система включает Cas9 (белок, способный модифицировать ДНК с использованием crРНК в качестве гида), CRISPR РНК (crРНК, включает РНК, используемую Cas9 для направления его в надлежащий участок ДНК хозяина, наряду с областью, которая связывается с tracrРНК

(как правило, в форме шпилечной петли), образующая активный комплекс с Cas9), трансактивирующую crRNA (tracrRNA, связывается с crRNA и образует активный комплекс с Cas9) и необязательный участок матрицы репарации ДНК (ДНК, которая направляет процесс клеточной репарации, позволяющий вставлять специфическую последовательность ДНК). В случае CRISPR/Cas9 часто используют плазмиду для трансфекции клеток-хозяев. crRNA должна быть спроектирована для каждого применения, поскольку она является последовательностью, которую Cas9 использует для идентификации и прямого связывания с целевой ДНК в клетке. Экспрессионная кассета CAR, несущая матрицу репарации, также должна быть спроектирована для каждого применения, поскольку она должна перекрываться с последовательностями на каждой стороне разреза и кодирует последовательность вставки. Несколько crRNA и tracrRNA могут быть упакованы совместно, с образованием единой гид-RNA (gRNA). Эта gRNA может быть соединена с геном Cas9 и введена в плазмиду для трансфекции в клетки.

Нуклеаза «цинковые пальцы» (ZFN) представляет собой искусственный фермент рестрикции, который получают путем соединения ДНК-связывающего домена «цинковый палец» с ДНК-расщепляющим доменом. Домен «цинковый палец» может быть сконструирован для нацеливания на определенные последовательности ДНК, что позволяет нуклеазам «цинковые пальцы» нацеливаться на нужные последовательности в геномах. ДНК-связывающие домены отдельных ZFN, как правило, содержат множество отдельных повторов «цинковый палец», и каждый может узнавать множество пар оснований. Наиболее простой способ получения нового домена «цинковый палец» заключается в объединении меньших «модулей» «цинковых пальцев» с известной специфичностью. Наиболее общим расщепляющим доменом в ZFN является неспецифический расщепляющий домен из эндонуклеазы рестрикции FokI II типа. С использованием эндогенного аппарата гомологичной рекомбинации (ГР) и несущей гомологичную матрицу ДНК экспрессионной кассеты CAR, ZFN могут быть использованы для вставки экспрессионной кассеты CAR в геном. Когда целевая последовательность расщепляется ZFN, аппарат ГР ищет гомологию между поврежденной хромосомой и гомологичной матрицей ДНК, а затем копирует последовательность матрицы между двумя разорванными концами хромосомы, в результате чего гомологичная матрица ДНК интегрируется в геном.

Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), представляют собой ферменты рестрикции, которые могут быть спроектированы для разрезания определенных последовательностей ДНК. Система TALEN действует почти по тому же принципу, что и ZFN. Их получают путем соединения ДНК-связывающего домена подобных активаторам транскрипции эффекторов с расщепляющим ДНК доменом. Подобные активаторам транскрипции эффекторы (TALE) состоят из повторяющихся мотивов из 33-34 аминокислот с двумя переменными положениями, с сильным узнаванием конкретных нуклеотидов. Путем сборки массивов таких TALE может быть сконструирован ДНК-связывающий домен TALE для связывания нужной последовательности ДНК, который будет направлять нуклеазу для разрезания

определенных участков в геноме. Экспрессия кДНК для применения в способах полинуклеотидной терапии может управляться с любого подходящего промотора (например, промоторов человеческого цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса 40 (SV40) или металлотионеина) и регулироваться любым подходящим регуляторным элементом или интроном млекопитающих (например, структурой энхансер/промотор/интрон фактора элонгации 1a). Например, при необходимости для управления экспрессией нуклеиновой кислоты можно использовать энхансеры, которые, как известно, предпочтительно управляют экспрессией генов в клетках определенных типов. Используемые энхансеры могут включать, без ограничения, те, которые характеризуют как энхансеры, специфические для тканей или клеток. Альтернативно, если в качестве терапевтической конструкции используют геномный клон, регуляция может быть опосредована генетически родственными регуляторными последовательностями или, при желании, регуляторными последовательностями, полученными из гетерологичного источника, включая любые промоторы или регуляторные элементы, описанные выше.

Способы доставки средств/систем для редактирования генома могут варьироваться в зависимости от потребностей. В конкретных вариантах осуществления компоненты выбранного способа редактирования генома доставляют в виде конструкций ДНК в одной или более плазидах. В конкретных вариантах осуществления компоненты доставляют при помощи вирусных векторов. Общепринятые способы доставки включают, но не ограничиваются ими, электропорацию, микроинъекцию, генную пушку, импалефекцию, гидростатическое давление, непрерывную инфузию, воздействие ультразвуком, магнитофекцию, аденоассоциированные вирусы, псевдотипирование белков оболочки вирусных векторов, цис и транс-действующие элементы способных к репликации векторов, вирус простого герпеса, а также химические носители (например, олигонуклеотиды, липоплексы, полимерсомы, полиплексы, дендримеры, неорганические наночастицы и проникающие в клетку пептиды).

5.6. Полипептиды

Описанное в настоящем описании изобретение относится к способам оптимизации аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности за счет изменения последовательности. Такие изменения могут включать определенные мутации, делеции, вставки или посттрансляционные модификации. Описанное в настоящем описании изобретение также охватывает аналоги любых природных полипептидов, описанных в настоящем описании (включая, но без ограничения, CD371, CD8, CD28, 4-1BB и CD3 ζ). Аналоги могут отличаться от природного полипептида, описанного в настоящем описании, за счет изменений аминокислотной последовательности, за счет посттрансляционных модификаций, или за счет и того, и другого. Аналоги могут быть на по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, или более, гомологичными или идентичными всей, или части, природной аминокислотной

последовательности по описанному в настоящем описании изобретению. Длина последовательности сравнения составляет по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 аминокислотных остатков, например, по меньшей мере 25, 50 или 75 аминокислотных остатков, или более 100 аминокислотных остатков. Опять-таки, в иллюстративном подходе для определения степени идентичности можно использовать программу BLAST, с оценкой вероятности от e^{-3} до e^{-100} , являющейся показателем близкородственных последовательностей. Модификации включают *in vivo* и *in vitro* химическую дериватизацию полипептидов, например, ацетилирование, карбоксилирование, фосфорилирование или гликозилирование; такие модификации могут иметь место во время синтеза полипептида или процессинга, или последующей обработки выделенными модифицирующими ферментами. Аналоги также могут отличаться от природных полипептидов изменениями в первичной последовательности. К ним относятся генетические варианты, как естественные, так и индуцированные (например, являющиеся следствием случайного мутагенеза при облучении или воздействии этанметилсульфата, или следствием сайт-специфического мутагенеза, как описано в сборниках Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2-е издание), CSH Press, 1989 или Ausubel *et al.*, выше). Также охвачены циклизированные пептиды, молекулы и аналоги, содержащие остатки, отличные от L-аминокислот, например, D-аминокислоты, или неприродные или синтетические аминокислоты, например, β - или γ -аминокислоты.

Помимо полноразмерных полипептидов, описанное в настоящем описании изобретение также относится к фрагментам любых из полипептидов, описанных в настоящем описании. Используемый в настоящем описании термин «фрагмент» означает по меньшей мере 5, 10, 13 или 15 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления фрагмент содержит по меньшей мере 20 последовательных аминокислот, по меньшей мере 30 последовательных аминокислот или по меньшей мере 50 последовательных аминокислот. В конкретных вариантах осуществления фрагмент содержит по меньшей мере 60-80, 100, 200, 300 или более последовательных аминокислот. Фрагменты могут быть получены способами, известными специалистам в данной области, или могут являться результатом нормального процессинга белка (например, удаления с заново образовавшегося полипептида аминокислот, которые не нужны для биологической активности, или удаления аминокислот за счет альтернативного сплайсинга мРНК или альтернативных событий процессинга белка).

5.7. Препараты и введение

Описанное в настоящем описании изобретение также относится к композициям, содержащим описанные в настоящем описании клетки. Композиции, содержащие описанные в настоящем описании клетки, могут быть предоставлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые могут быть буферизованы до выбранного значения pH. Жидкие препараты обычно готовить легче, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько более

удобны в применении, особенно в виде инъекций. Вязкие композиции, с другой стороны, могут быть сформулированы в соответствующем диапазоне вязкости для обеспечения более длительного контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное), и их соответствующие смеси.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения генетически модифицированных клеток в необходимое количество соответствующего растворителя с различными количествами других ингредиентов, по мере необходимости. Такие композиции могут находиться в смеси с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза или тому подобное. Композиции также могут быть лиофилизированными. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие средства или эмульгаторы (например, метилцеллюлозу), регулирующие pH средства, желирующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы, красители и тому подобное, в зависимости от пути введения и желаемого препарата. Для изготовления соответствующих препаратов без излишнего экспериментирования можно обращаться к стандартным литературным источникам, таким как сборник «REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE», 17-е издание, 1985 г., содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

Можно вносить различные добавки, повышающие стабильность и стерильность композиций, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатообразующие средства и буферы. Предотвращать действие микроорганизмов можно за счет различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и тому подобного. Пролонгированной абсорбции инъекционного фармацевтического препарата можно добиваться за счет использования средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина. Однако в соответствии с описанным в настоящем описании изобретением любые используемые носители, разбавители или добавки должны быть совместимыми с генетически модифицированными клетками.

Композиции могут быть изотоническими, то есть, они могут иметь такое же осмотическое давление, как кровь и слезная жидкость. Желаемой изотоничности композиции можно добиваться за счет использования хлорида натрия или других фармацевтически приемлемых средств, таких как декстроза, борная кислота, тартрат натрия, пропиленгликоль или другие неорганические или органические растворенные вещества. Хлорид натрия может быть особенно подходящим для буферов, содержащих ионы натрия.

Вязкость композиций, при желании, можно поддерживать на выбранном уровне за счет использования фармацевтически приемлемого загустителя. Например,

метилцеллюлоза является легкодоступной, доступной экономически и легкой в обращении. Другие подходящие загустители включают, например, ксантановую камедь, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, карбомер и тому подобное. Концентрация загустителя может зависеть от выбранного средства. Важным моментом является использование такого количества, которое позволит достичь выбранной вязкости. Очевидно, что выбор подходящих носителей и других добавок будет зависеть от точного пути введения и характера конкретной лекарственной формы, например, жидкой лекарственной формы (например, от того, будет ли композиция сформулирована в раствор, суспензию, гель или другую жидкую форму, например, форму с отсроченным высвобождением или заполненную жидкостью форму).

Композиции, содержащие описанные в настоящем описании клетки, могут быть введены системно или непосредственно субъекту для индукции и/или усиления иммунного ответа на антиген, и/или для лечения и/или предотвращения новообразования. В конкретных вариантах осуществления описанные в настоящем описании клетки или композиции, содержащие их, вводят непосредственно в интересующий орган (например, орган, пораженный новообразованием). Альтернативно, описанные в настоящем описании клетки или композиции, содержащие их, вводят опосредованно в интересующий орган, например, путем введения в кровеносную систему (например, сосудистую сеть опухоли). Можно вводить средства для размножения или дифференциации клеток до, во время или после введения клеток или композиций с целью увеличения продуцирования клеток (например, Т-клеток или НК-клеток) *in vitro* или *in vivo*.

Описанные в настоящем описании клетки можно вводить в любом физиологически приемлемом носителе, как правило, внутрисосудистым введением, хотя их также можно вводить в кость или другой удобный участок, где клетки могут найти соответствующую зону для регенерации и дифференциации (например, тимус).

Количество клеток, вводимых субъекту, получающему лечение, может варьироваться. В конкретных вариантах осуществления субъекту вводят от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{10} , от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^7 , от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^7 , от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 или от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 описанных в настоящем описании клеток. Более эффективные клетки можно вводить в еще меньшем количестве. Как правило, будет введено по меньшей мере приблизительно 1×10^5 клеток, с достижением в итоге приблизительно 1×10^{10} или более клеток. В конкретных вариантах осуществления субъекту вводят по меньшей мере приблизительно 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , приблизительно 5×10^6 , приблизительно 1×10^7 , приблизительно 5×10^7 , приблизительно 1×10^8 или приблизительно 5×10^8 описанных в настоящем описании клеток. В конкретных вариантах осуществления субъекту вводят приблизительно 1×10^6 описанных в настоящем описании клеток. Точное определение того, что будет считаться эффективной дозой, может быть основано на факторах, индивидуальных для каждого субъекта, включая размер, возраст, пол, массу тела и состояние здоровья конкретного субъекта. Дозы могут с легкостью определять

специалисты в данной области на основании настоящего документа и знаний, накопленных в данной области.

Описанные в настоящем описании клетки могут представлять собой очищенную популяцию клеток. Специалисты в данной области могут с легкостью определять процентное содержание описанных в настоящем описании клеток в популяции с использованием различных хорошо известных методов, таких как активированная флуоресценцией сортировка клеток (FACS). Подходящие диапазоны чистоты в популяциях, включающих описанные в настоящем описании иммунореактивные клетки, составляют от приблизительно 50% до приблизительно 55%, от приблизительно 5% до приблизительно 60% и от приблизительно 65% до приблизительно 70%. В конкретных вариантах осуществления степень чистоты составляет от приблизительно 70% до приблизительно 75%, от приблизительно 75% до приблизительно 80% или от приблизительно 80% до приблизительно 85%. В конкретных вариантах осуществления степень чистоты составляет от приблизительно 85% до приблизительно 90%, от приблизительно 90% до приблизительно 95% и от приблизительно 95% до приблизительно 100%. Дозы могут быть легко скорректированы специалистами в данной области (например, снижение чистоты может потребовать увеличения дозировки). Клетки можно вводить с помощью инъекции, катетера или тому подобного.

Квалифицированный специалист сможет с легкостью определять количество клеток и оптимальные добавки, среды и/или носители в композициях для введения в способах. Как правило, любые добавки (помимо активной клетки(клеток) и/или средства(средств)) присутствуют в количестве от 0,001 до 50% (по массе) от массы раствора в фосфатно-солевом буфере, и активный ингредиент присутствует в количестве порядка микрограмм или миллиграмм, например, от приблизительно 0,0001 до приблизительно 5 масс%, от приблизительно 0,0001 до приблизительно 1 масс%, от приблизительно 0,0001 до приблизительно 0,05 масс% или от приблизительно 0,001 до приблизительно 20 масс%, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 масс% или от приблизительно 0,05 до приблизительно 5 масс%. Для любой композиции, которую предстоит вводить животному или человеку, можно определять следующее: токсичность, например, путем определения летальной дозы (LD) и LD50 в соответствующей животной модели, например, модели на грызунах, таких как мышь; дозу композиции(й), состав ее компонентов и время введения композиции(й), вызывающей подходящий ответ. Такие определения не требуют излишнего экспериментирования с учетом знаний квалифицированного специалиста, настоящего описания и документов, цитируемых в настоящем описании. Моменты времени для последовательных введений также могут быть определены без излишнего экспериментирования.

В конкретных вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую описанные в настоящем описании клетки и фармацевтически приемлемый носитель.

Введение композиций может быть аутологичным или гетерологичным. Например,

клетки могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или иному, совместимому субъекту. Можно вводить полученные из периферической крови клетки или их потомство (например, полученное *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*). При введении описанной в настоящем описании композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей описанные в настоящем описании клетки) она может быть сформулирована в стандартной дозированной инъекционной форме (раствор, суспензия, эмульсия).

Описанные в настоящем описании клетки и композиции можно вводить любым способом, известным в данной области, включая, но без ограничения, пероральное введение, внутривенное введение, подкожное введение, внутриузловое введение, внутриопухолевое введение, интратекальное введение, интраплевральное введение, внутрикостное введение, внутрибрюшинное введение, плевральное введение и прямое введение субъекту.

5.8. Способы лечения

Описанные в настоящем описании клетки и композиции, содержащие их, можно использовать для лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования. Такие клетки можно вводить субъекту (например, субъекту-человеку), который нуждается в этом, для лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования (например, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), множественной миеломы, неходжскинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), глиобластомы). В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. Т-клетка может представлять собой CD4⁺ Т-клетку или CD8⁺ Т-клетку. В конкретных вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку.

Описанное в настоящем описании изобретение относится к способам индукции и/или усиления иммунного ответа у субъекта, который нуждается в этом. Описанные в настоящем описании клетки и композиции, содержащие их, можно использовать для терапии или в качестве лекарственного препарата. Описанное в настоящем описании изобретение относится к различным способам с использованием клеток (например, Т-клеток) или композиций, содержащих их. Например, описанные в настоящем описании клетки и композиции, содержащие их, можно использовать для уменьшения опухолевого бремени у субъекта. Описанная в настоящем описании клетка может уменьшать количество опухолевых клеток, уменьшать размер опухоли и/или уничтожать опухоль у субъекта. Описанные в настоящем описании клетки и композиции, содержащие их, можно использовать для лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования у субъекта. Описанные в настоящем описании клетки и композиции, содержащие их, можно использовать для продления срока выживания субъекта, страдающего от опухоли или новообразования. Такие способы включают введение описанных в настоящем описании клеток или композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей их, для достижения желаемого эффекта, например, временного облегчения существующего состояния или предотвращения рецидива. В случае лечения вводимое количество представляет собой количество, эффективное для оказания желаемого эффекта.

Эффективное количество может быть предоставлено за одно введение или серию введений. Эффективное количество может быть предоставлено в виде болюса или путем непрерывной перфузии.

Описанное в настоящем описании изобретение относится к различным способам использования клеток (например, Т-клеток) или композиций, содержащих их. Например, описанное в настоящем описании изобретение относится к способам уменьшения опухолевого бремени у субъекта. В конкретных вариантах осуществления способ уменьшения опухолевого бремени включает введение субъекту описанных в настоящем описании клеток или композиции, содержащей их. Описанная в настоящем описании клетка может уменьшать количество опухолевых клеток, уменьшать размер опухоли и/или уничтожать опухоль у субъекта.

Опухоль или новообразование может представлять собой солидную опухоль. Неограничивающие примеры солидных опухолей включают мезотелиому, рак легких, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак молочной железы, рак толстого кишечника, плевральную опухоль, глиобластому, рак пищевода, рак желудка, синовиальную саркому, карциному тимуса, карциному эндометрия, рак желудка и холангиокарциному.

Описанное в настоящем описании изобретение также относится к способам увеличения или продления срока выживания субъекта, имеющего опухоль или новообразование. В конкретных вариантах осуществления способ увеличения или продления срока выживания субъекта, имеющего опухоль или новообразование, включает введение субъекту описанных в настоящем описании иммунореактивных клеток или композиции, содержащей их. Способ может приводить к уменьшению или устранению опухолевого бремени у субъекта. Кроме того, описанное в настоящем описании изобретение относится к способам усиления иммунного ответа у субъекта, включающим введение субъекту описанных в настоящем описании клеток или композиции, содержащей их. Описанное в настоящем описании изобретение также относится к способам лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования у субъекта, включающим введение субъекту описанных в настоящем описании клеток или композиции, содержащей их.

Неограничивающие примеры новообразований или опухолей включают острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), множественную миелому, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), лимфому (лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому), глиобластому, миелодиспластический синдром (МДС) и хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), рак костей, рак кишечника, рак печени, рак кожи, рак головы или шеи, меланому (кожную или внутриглазную злокачественную меланому), рак почки (например, светлоклеточную карциному), рак горла, рак предстательной железы (например, гормон-рефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак клеток крови (например, лейкозы, лимфомы и миеломы), рак тела матки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак желудка, рак яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, лейкозы (например, острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз,

острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, солидные опухоли в детском возрасте, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразования в центральной нервной системе (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль оси позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, вызванные экологическими факторами, в том числе вызванные асбестом, раковые заболевания, включая макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, а также солидные опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовой железы, карциному сальной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак слюнной железы, рак тела матки, рак яичка, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, шванному, менингиому, меланому, нейробластому и ретинобластому).

В конкретных вариантах осуществления опухоль, или новообразование, выбрана из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), множественной миеломы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, глиобластомы, миелодиспластического синдрома (МДС) и хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ). В конкретных вариантах осуществления опухоль или новообразование представляет собой ОМЛ.

Субъекты могут иметь прогрессирующую форму заболевания, в этом случае цель лечения может включать облегчение или обращение вспять заболевания, и/или ослабление побочных эффектов. Субъекты могут иметь в анамнезе состояние, по поводу которого они уже получали лечение, в этом случае терапевтическая цель, как правило, включает снижение или отсрочку риска рецидива.

Вследствие поверхностной экспрессии описанного в настоящем описании CD371-нацеленного антиген-узнающего рецептора адоптивно перенесенные клетки (например, иммунореактивные клетки, например, Т-клетки или НК-клетки) наделены повышенной и избирательной цитолитической активностью в зоне опухоли. Кроме того, после их

локализации в зоне опухоли или вирусной инфекции и последующей пролиферации клетки превращают зону опухоли или вирусной инфекции в зону массового притока иммунных клеток широкого спектра, вовлеченных в физиологический противоопухолевый или противовирусный ответ (опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, НК-, НКТ-клеток, дендритных клеток и макрофагов).

В описанные в настоящем описании клетки (например, Т-клетки) можно вносить дополнительные модификации для предотвращения или минимизации рисков иммунологических осложнений (известных как «злокачественная трансформация Т-клеток»), например, реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), или, когда здоровые ткани экспрессируют те же целевые антигены, что и опухолевые клетки, возникновения результатов, аналогичных РТПХ. Потенциальным решением данной проблемы является введение суицидного гена в описанные в настоящем описании клетки. Подходящие суицидные гены включают, но без ограничения, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (hsv-tk), индуцируемый суицидный ген каспазы 9 (iCasp-9) и ген укороченного полипептида рецептора человеческого эпидермального фактора роста (EGFRt). В конкретных вариантах осуществления суицидный ген представляет собой ген полипептида EGFRt. Полипептид EGFRt может способствовать элиминации Т-клеток при введении моноклонального анти-EGFR антитела (например, цетуксимаба). EGFRt может быть ковалентно связан с верхней частью антиген-узнающего рецептора (например, CAR). Суицидный ген может быть включен в вектор, содержащий нуклеиновые кислоты, кодирующие описанный в настоящем описании антиген-узнающий рецептор (например, CAR). В этом случае введение пролекарства, разработанного для активации суицидного гена (например, пролекарства (например, AP1903, которое может активировать iCasp-9) в период злокачественной трансформации Т-клеток (например, РТПХ) запускает апоптоз в клетках с активированным суицидным геном, экспрессирующих антиген-узнающий рецептор (например, CAR). Включение суицидного гена в описанный в настоящем описании антиген-узнающий рецептор (например, CAR) обеспечивает дополнительный уровень безопасности, позволяя устранять большую часть экспрессирующих рецептор клеток в течение очень короткого периода времени. Описанная в настоящем описании клетка (например, Т-клетка), имеющая суицидный ген, может быть заблаговременно элиминирована в конкретный момент времени после инфузии клетки или уничтожена при первых признаках токсичности.

5.9. Наборы

Описанное в настоящем описании изобретение относится к наборам для индукции и/или усиления иммунного ответа у субъекта, лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования у субъекта, уменьшения опухолевого бремени у субъекта и/или увеличения или продления срока выживания субъекта, имеющего опухоль или новообразование. В конкретных вариантах осуществления набор включает описанные в настоящем описании клетки, или композицию, содержащую их. В конкретных вариантах осуществления набор включает стерильный контейнер; такие контейнеры могут

представлять собой коробки, ампулы, бутылки, флаконы, пробирки, мешки, пакеты, блистерные упаковки или другие подходящие формы контейнеров, известные в данной области. Такие контейнеры могут быть изготовлены из пластика, стекла, ламинированной бумаги, металлической фольги или других материалов, пригодных для хранения лекарственных средств. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления набор включает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в настоящем описании CD371-нацеленный антиген-узнающий рецептор (например, CAR или TCR).

При желании, клетки и/или молекулы нуклеиновой кислоты предоставляют совместно с инструкциями по введению клеток или молекул нуклеиновой кислоты субъекту, страдающему от, или имеющему риск развития, опухоли или новообразования. Инструкции, как правило, включают информацию о применении композиции для лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования. В конкретных вариантах осуществления инструкции включают по меньшей мере одно из следующего: описание лекарственного средства; расписание дозирования, а также введение с целью лечения или предотвращения опухоли или новообразования; меры предосторожности; предупреждения; показания; противопоказания; информацию о передозировке; побочные реакции; фармакологические результаты у животных; результаты клинических испытаний и/или литературные источники. Инструкции могут быть напечатаны непосредственно на контейнере (при наличии) или в виде этикетки, наклеиваемой на контейнер, или в виде отдельного листа, брошюры, карточки или папки, поставляемой в комплекте, или вместе с контейнером.

6. ПРИМЕРЫ

При осуществлении на практике настоящего изобретения используют, если нет иных указаний, общепринятые методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции квалифицированного специалиста. Такие методы подробно описаны в литературе, например, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», второе издание (Sambrook, 1989); «Oligonucleotide Synthesis» (Gait, 1984); «Animal Cell Culture» (Freshney, 1987); «Methods in Enzymology», «Handbook of Experimental Immunology» (Weir, 1996); «Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells» (Miller and Calos, 1987); «Current Protocols in Molecular Biology» (Ausubel, 1987); «PCR: The Polymerase Chain Reaction», (Mullis, 1994); «Current Protocols in Immunology» (Coligan, 1991). Эти методы применимы для получения полинуклеотидов и полипептидов, описанных в настоящем описании, и, следовательно, могут быть рассмотрены для применения при осуществлении на практике описанного в настоящем описании изобретения. Особенно полезные методы для конкретных вариантов осуществления будут рассмотрены в последующих разделах.

Следующие далее примеры изложены таким образом, чтобы предоставить специалистам в данной области полное раскрытие и описание способов получения и применения описанных в настоящем описании клеток и композиций, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением.

Пример 1 - Получение CD371-нацеленных CAR

Были получены следующие шесть CD371-нацеленных CAR: «Et.B10L3H_MT_h28z», «Et.B10L4H_MT_hBBz», «Et.B10L4H_MT_h28z», «Et.B10H3L_MT_h28z», «Et.B10H4L_MT_h28z», «Et.C3H3L_MT_h28z», «Et.C3L3H_MT_h28z» и «Et.D6L3H_MT_h28z». Структуры CAR представлены на Фигуре 1.

Как показано на Фигуре 2, CAR были обнаружены благодаря EGFRt и Мус-метке на поверхности трансдуцированных человеческих Т-клеток. Антитела против EGFRt (цетуксимаб-APC) и Мус-метки (9B11-PE) были использованы для обнаружения поверхностной экспрессии EGFRt и человеческого CAR против человеческих мишеней в конструкциях на основе В10. Контроли включали не трансдуцированные человеческие Т-клетки, не экспрессирующие EGFRt или Мус-метку, а также не содержащие Мус-метку конструкции CAR Etah19h28Z (Т-клетки с CAR против CD19 человека) и EtC1HVh28Z (Т-клетки с CAR против CD371, полученным из мышинового антитела 1075.7 против CD371 человека).

Пример 2 - *In vitro* цитотоксическая активность CD371-нацеленных CAR Т-клеток

Т-клетки были трансдуцированы рядом CD371-нацеленных CAR (то есть, «Et.C1HVh28Z», «Et.B10LH_MT_h28Z», «Et.B10LHg4s_MT_h28Z», «Et.B10HL_MT_h28Z», «Et.C3HL_MT_h28Z», «Et.C3LH_MT_h28Z» и «Et.D6LH_MT_h28Z»). Et.C1HVh28Z был использован в качестве положительного контроля и был получен из мышинового антитела 1075.7 против CD371 человека. «Et.B10LHg4s_MT_hDEL» представляют собой нефункциональные CD371-нацеленные CAR Т-клетки (на основе В10L4H, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета). Эти CD371-нацеленные CAR Т-клетки культивировали совместно с CD371+ клетками U937, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (U937gL), при разных соотношениях эффектор:мишень. Через 24 часа измеряли билюминесценцию и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CD371-нацеленных CAR Т-клеток (на основе В10L4H, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937gL. Результаты представлены на Фигуре 3. Как показано на Фигуре 3, CD371-нацеленные CAR Т-клетки были способны лизировать клетки, экспрессирующие CD371.

Пример 3 - *In vitro* цитотоксическая активность CD371-нацеленных CAR Т-клеток

Т-клетки были трансдуцированы рядом CD371-нацеленных CAR (то есть, «Et.C1HVh28Z», «Et.B10L4H_MT_h28Z», «Et.B10L3H_MT_h28Z», «Et.B10L4H_MT_hBBZ», «Et.B10H3L_MT_h28Z», «Et.C3HL_MT_h28Z», «Et.C3LH_MT_h28Z» и «Et.M195_MT_h28Z»). Et.C1HVh28Z был использован в качестве положительного контроля и был получен из мышинового антитела 1075.7 против CD371 человека. «Et.M195MTh28Z» представляют собой Т-клетки с CD33-нацеленным CAR, полученным из мышинового антитела M195 против CD33 человека. «Et.M195MTh28Z»

использовали в качестве положительного контроля, поскольку клетки U937 также экспрессируют CD33. Полученные от здоровых доноров (то есть, донора С и донора D) CD371-нацеленные CAR Т-клетки совместно культивировали с CD33+/CD371+ клетками U937, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (U937gL), при разных соотношениях эффектор:мишень. Через 24 часа измеряли биолюминесценцию и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CD371-нацеленных CAR Т-клеток (на основе B10L4H, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937gL. Результаты представлены на Фигуре 4 (для донора С) и Фигуре 5 (для донора D). Как показано на Фигурах 4 и 5, CAR (HL/LH) Т-клетки на основе B10 превосходили по эффективности CAR Т-клетки на основе С3.

Пример 4 - Стимуляция антигеном CD371-нацеленных CAR Т-клеток

Полученные от здоровых доноров (то есть, донора С и донора D) CD371-нацеленные CAR Т-клетки совместно культивировали с CD33+/CD371+ клетками U937gL при соотношении Э:М, составляющем 1:12,5, и при концентрации 30000 CAR+/мл. Приблизительно каждые 4-5 дней CAR Т-клетки подсчитывали и характеризовали методом проточной цитометрии, и исходное количество опухолевых клеток добавляли обратно в культуру (указано стрелками). Результаты представлены на Фигуре 6 (для донора С) и Фигуре 7 (для донора D). «Et.B10LHdel» представляет собой Т-клеточный нефункциональный CAR (без сигнальных доменов). «Et.C1HVh28Z» представляет собой CD371-нацеленный CAR, полученный из мышинового антитела 1075.7 против CD371 человека, и «EtM195MTh28Z» или «M19528» представляет собой Т-клеточный CD33-нацеленный CAR, полученный из мышинового антитела M195 против CD33 человека. Как показано на Фигурах 6 и 7, CAR Т-клетки на основе B10 превосходили по эффективности CAR Т-клетки на основе С3 в долгосрочном анализе с повторной стимуляцией.

Пример 5 - *In vitro* цитотоксическая активность CD371-нацеленных CAR Т-клеток

Полученные от здоровых доноров (то есть, донора А и донора В) CD371-нацеленные CAR Т-клетки совместно культивировали с CD371-положительными клетками U937 или клетками HL60, экспрессирующими GFP и люциферазу светляков (U937gL или HL60gL), при разных соотношениях эффектор:мишень. Биолюминесценцию измеряли через 24 часа и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CD371-нацеленных CAR Т-клеток (на основе B10L4H, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937gL. Результаты представлены на Фигурах 8А и 8В (для клеток U937gL) и Фигурах 9А и 9В (для клеток HL60). Как показано на Фигурах 8А-8В и 9А-9В, CD371-нацеленные CAR Т-клетки на основе B10HL превосходили по эффективности CD371-нацеленные CAR Т-клетки на основе B10LH.

Пример 6 - Антиген-специфическая цитотоксическая активность CD371-нацеленных CAR Т-клеток

Оценивали, является ли цитотоксическая активность CD371-нацеленных CAR Т-

клеток специфической для CD371. Получали линии клеток с нокаутом CD371 человека (чCD371). Был произведен нокаут CD371 человека в клетках HL60gL и U937gL с использованием CRISPR, и нокаут был подтвержден методом проточной цитометрии с использованием APC-конъюгированного антитела против CD371 человека. Смотри Фигуру 10.

Полученные от здоровых доноров (то есть, донора А и донора В) CD371-нацеленные CAR Т-клетки совместно культивировали с антиген-отрицательными клетками U937 или HL60, экспрессирующими RFP и люциферазу ципридины (U937RFPсуп.371КО или HLgL.371КО), при разных соотношениях эффектор:мишень. Через 24 часа измеряли биолюминесценцию и строили график в виде процента от обнаруживаемого сигнала при совместном культивировании нефункциональных CD371-нацеленных CAR Т-клеток (на основе В10L4Н, но без сигнального домена CD28 или CD3-дзета) и U937RFPсуп.371КО. Результаты представлены на Фигурах 11А-11В (для клеток U937) и Фигурах 12А-12В (для клеток HL60). Как показано на Фигурах 11А-11В и 12А-12В, CD371-нацеленные CAR Т-клетки как на основе В10HL, так и на основе В10LН, не проявляли существенной цитотоксичности в отношении CD371-отрицательных клеток U937 и проявляли ограниченную цитотоксичность в отношении CD371-отрицательных клеток HL60.

Пример 7 - Секретия цитокинов CD371-нацеленными CAR Т-клетками

Оценивали способность CD371-нацеленных CAR Т-клеток к продуцированию цитокинов. CD371-нацеленные CAR Т-клетки культивировали отдельно, а также совместно культивировали с CD371-отрицательными опухолевыми клетками или CD371-положительными клетками U937 при соотношении эффектор:мишень, составляющем 1:1 (40000:40000 клеток в 200 мкл). Через 24 часа культуральный супернатант собирали и определяли уровни секреции IFN γ , IL-2 и TNF α в мультиплексном анализе с гранулами. Результаты представлены на Фигурах 13А-13В (для IFN γ), Фигурах 14А-14В (для IL-2) и Фигурах 15А-15В (для TNF α). Как показано на Фигурах 13А-13В, Фигурах 14А-14В и Фигурах 15А-15В, CAR Т-клетки на основе В10HL продуцировали больше цитокинов зависимым от антигена образом, чем CAR Т-клетки на основе В10LН.

Пример 8 - Способность к пролиферации CD371-нацеленных CAR Т-клеток

CAR Т-клетки получали от двух здоровых доноров (то есть, донора А и донора В). CD371-нацеленные CAR Т-клетки совместно культивировали с CD371+ клетками U937gL при соотношении Э:М, составляющем 1:5, и при концентрации 50000 CAR+/мл. CAR Т-клетки подсчитывали приблизительно каждые 5 дней и характеризовали методом проточной цитометрии. Исходное количество опухолевых клеток добавляли обратно в культуру в моменты времени, указанные стрелками. Результаты представлены на Фигуре 16. Как показано на Фигуре 16, CD371-нацеленные CAR Т-клетки на основе В10HL и на основе В10LН демонстрировали почти сопоставимую способность к пролиферации *in vitro*.

Пример 9 - *In vivo* противоопухолевая активность CD371-нацеленных CAR Т-клеток

Оценивали *in vivo* противоопухолевую активность CD371-нацеленных CAR Т-

клеток на основе B10. На Фигуре 17 представлена мышьяная модель ксенотрансплантата ОМЛ. Мышам NCG инокулировали 5×10^4 U937gL клеток ОМЛ линии FAB-M5 через хвостовую вену, и через три дня вводили приблизительно $1,25 \times 10^6$ CAR Т-клеток. Контролировали выживаемость мышей. Результаты представлены на Фигуре 18 (для донора 1) и Фигуре 19 (для донора 2). Как показано на Фигурах 18 и 19, CAR Т-клетки на основе B10HL приводили к более продолжительному выживанию мышей с ксенотрансплантатом ОМЛ в сравнении с CAR Т-клетками на основе B10LH.

Затем оценивали, является ли *in vivo* активность зависимой от дозы. Мышам NCG инокулировали $5,0 \times 10^4$ опухолевых клеток U937gL и через три дня вводили CAR Т-клетки в разных дозах ($1,25 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$, $5,0 \times 10^5$ и $1,0 \times 10^6$). Результаты представлены на Фигуре 20. Как показано на Фигуре 20, CAR Т-клетки на основе B10HL превосходили по эффективности CAR Т-клетки на основе B10LH в модели зависимого от дозы лечения.

Пример 10: Связывание B10 scFv с CD371-экспрессирующими линейными клетками

Оценивали связывание B10 (также называемого «1B10») scFv в обеих ориентациях (V_H - V_L или V_L - V_H) с CD371-экспрессирующими клетками. Результаты представлены на Фигуре 21. Как показано на Фигуре 21, связывание с клетками было обнаружено в случае B10 scFv в ориентации V_L - V_H . Однако связывание B10 scFv в ориентации V_H - V_L не наблюдали при определении методом проточной цитометрии, это свидетельствовало о низкой аффинности и, следовательно, о необходимости двухвалентного связывания.

Пример 11: Связывание B10 scFv с рекомбинантным CD371 в растворе

Для определения аффинности scFv биотинилированный CD371 захватывали при помощи стрептавидина, и растворимый scFv использовали в качестве аналита. В Таблице 8 приведены константы диссоциации (K_D), скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) для разных форматов scFv. В соответствии с результатами проточной цитометрии наблюдали слабое связывание 1B10 scFv в ориентации V_H - V_L , но константу диссоциации невозможно было рассчитать ни одним методом подгонки кривой.

Таким образом, удивительно, что CAR, содержащий scFv с более низкой аффинностью связывания, превосходил *in vitro* и *in vivo* CAR, содержащий scFv с более высокой аффинностью связывания, как показано в Примерах 5, 7 и 9.

Таблица 8. Аффинность связывания B10 scFv в ориентации V_H - V_L или V_L - V_H с растворимым CD371

Формат	K_D (нМ)	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)
V_L - V_H scFv	16	$5,99 \times 10^5$	$9,52 \times 10^{-3}$
V_H - V_L scFv	Слабое связывание	Н/П	Н/П

Пример 12: *In vivo* и *in vitro* активность Т-клеток с CAR второго поколения на основе B10HL

Были успешно получены Т-клетки с CAR второго поколения на основе B10HL, содержащим укороченный EGFR (Et), Мус-метку (MT) и G4S линкеры разной длины:

- Et.B10H4L_MT_h28Z описан в Примере 1.
- Et.B10H1L_MT_h28Z содержал scFv на основе B10 (обозначенный B10H1L), имеющий ориентацию V_H-V_L и G4S линкер длиной 5 аминокислот (GGGGS [SEQ ID NO: 93]), а также сигнальный домен на основе CD28Z.
- Et.B10H2L_MT_h28Z содержал scFv на основе B10 (обозначенный B10H2L), имеющий ориентацию V_H-V_L и G4S линкер длиной 10 аминокислот (GGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 94]), а также сигнальный домен на основе CD28Z.
- Et.B10H5L_MT_h28Z содержал scFv на основе B10 (обозначенный B10H5L), имеющий ориентацию V_H-V_L и G4S линкер длиной 24 аминокислоты (GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 91]), а также сигнальный домен на основе CD28Z.
- Et.B10H6L_MT_h28Z содержал scFv на основе B10 (обозначенный B10H6L), имеющий ориентацию V_H-V_L и G4S линкер длиной 29 аминокислот (GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 92]), а также сигнальный домен на основе CD28Z.

Были получены дополнительные Т-клетки с CAR второго поколения на основе B10H4L, с конститутивной секрецией либо IL18 (обозначенные «Et.B10H4Lmt28ZpIL18»), либо IL33 (обозначенные «Et.B10H4Lmt28ZpIL33»). Т-клетки, представляющие собой Et.B10H4Lmt28ZpIL18, содержат CAR, обозначенный «Et.B10H4L_MT_h28Z», и экзогенный полипептид IL-18 (например, экзогенный полипептид IL-18, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO 103). Т-клетки, представляющие собой Et.B10H4Lmt28ZpIL33, содержат CAR, обозначенный «Et.B10H4L_MT_h28Z», и экзогенный полипептид IL-33 (например, экзогенный полипептид IL-33, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO 105).

Как показано на Фигуре 22, CAR Т-клетки, имеющие scFv в ориентации V_H-V_L , обладают более высокой цитотоксичностью в отношении клеток U937, чем CAR Т-клетки, имеющие scFv в ориентации V_L-V_H . Для оценки *in vivo* активности этих CAR Т-клеток на основе B10 мышам NCG инокулировали 5×10^4 опухолевых клеток U937gL и вводили различные дозы CAR Т-клеток. Выживаемость получавших лечение мышей контролировали и регистрировали. Как показано на Фигуре 23, в дозе 5×10^5 CAR Т-клеток B10H3L, B10H5L, и IL33-секретирующие, нацеленные на CD371 человека CAR Т-клетки на основе B10H4L превосходили по эффективности CAR Т-клетки на основе B10H4L. Как показано на Фигуре 24, в дозе $2,5 \times 10^5$ CAR Т-клеток IL18- и IL33-секретирующие, нацеленные на CD371 человека CAR Т-клетки на основе B10H4L превосходили по эффективности CAR Т-клетки на основе B10H4L. Как показано на Фигуре 25, в низкой дозе $1,0 \times 10^5$ CAR Т-клеток IL18-секретирующие, нацеленные на CD371 человека CAR Т-клетки на основе B10H4L превосходили по эффективности другие CAR Т-клетки.

Варианты осуществления описанного в настоящем описании изобретения

Из приведенного выше описания будет очевидно, что вариации и модификации

могут быть внесены в описанное в настоящем описании изобретение для приспособления его к различным вариантам применения и условиям. Такие варианты осуществления также входят в объем следующей далее формулы изобретения.

Приведение перечня элементов в любом определении переменной в настоящем описании включает определения этой переменной как любого отдельного элемента или комбинации (или подкомбинации) перечисленных элементов. Приведение в настоящем описании варианта осуществления включает данный вариант осуществления в виде любого отдельного варианта осуществления или в сочетании с любыми другими вариантами осуществления или их частями.

Все патенты и публикации, упомянутые в данной спецификации, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если было бы специально и индивидуально указано, что каждый отдельный патент и публикация включены посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антиген-узнающий рецептор, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где внеклеточный антигенсвязывающий домен специфически связывает CD371.

2. Антиген-узнающий рецептор по п.1, где внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

3. Антиген-узнающий рецептор по п.2, где внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой scFv человека.

4. Антиген-узнающий рецептор по п.1, где внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой Fab, который, необязательно, является сшитым.

5. Антиген-узнающий рецептор по п.1, где внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой F(ab)₂.

6. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 2-5, где один или более из scFv, Fab и F(ab)₂ заключены в слитом белке с гетерологичной последовательностью, с образованием внеклеточного антигенсвязывающего домена.

7. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-6, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

(a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, или ее консервативную модификацию; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, или ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, или ее консервативную модификацию;

(b) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию;

(c) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, или ее консервативную модификацию; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, или ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, или ее консервативную модификацию;

(d) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 462, или ее консервативную модификацию; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47, или ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63.

12. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-11, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30; CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31; CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33.

13. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-12, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

14. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-13, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

15. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-14, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

16. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-15, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

17. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-16, где внеклеточный

антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

18. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-17, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

19. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-18, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

20. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-19, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

21. Антиген-узнающий рецептор по п.14, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

(с) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(e) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; или

(f) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

22. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-21, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

23. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-22, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена.

24. Антиген-узнающий рецептор по п.23, где линкер имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93 или SEQ ID NO: 94.

25. Антиген-узнающий рецептор по п.23, где линкер имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

26. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-25, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит сигнальный пептид, ковалентно связанный с 5'-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена.

27. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-26, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, которые расположены в направлении от N- к C-концу следующим образом: V_H-V_L .

28. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-26, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD371 с низкой аффинностью связывания.

29. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-26, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD371 с константой диссоциации (K_d), составляющей 1×10^{-8} М или более.

30. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-29, где трансмембранный домен содержит полипептид CD8, полипептид CD28, полипептид CD3 ζ , полипептид CD4, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид CTLA-4, полипептид

PD-1, полипептид LAG-3, полипептид 2B4, полипептид BTLA или их сочетание.

31. Антиген-узнающий рецептор по п.30, где трансмембранный домен содержит полипептид CD28.

32. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-31, где внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид CD3 ζ .

33. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-32, где внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область.

34. Антиген-узнающий рецептор по п.33, где по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид DAP-10 или их сочетание.

35. Антиген-узнающий рецептор по п.33 или 34, где по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28 или полипептид 4-1BB.

36. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-35, который представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), Т-клеточный рецептор (TCR) или подобный Т-клеточному рецептору слитый белок.

37. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-36, который представляет собой CAR.

38. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-37, который экспрессируется рекомбинантно.

39. Антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-38, который экспрессируется с вектора.

40. Антиген-узнающий рецептор по п.39, где вектор представляет собой γ -ретровирусный вектор.

41. Клетка, содержащая антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-40.

42. Клетка по п.41, которая трансдуцирована антиген-узнающим рецептором.

43. Клетка по п.41 или 42, где антиген-узнающий рецептор конститутивно экспрессируется на поверхности клетки.

44. Клетка по любому из пп. 41-43, которая генетически модифицирована для экспрессии цитокина или его фрагмента.

45. Клетка по п.44, которая содержит экзогенный полипептид цитокина или его фрагмента.

46. Клетка по п.44 или 45, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую цитокин или его фрагмент.

47. Клетка по любому из пп. 44-46, где цитокин выбран из группы, состоящей из IL-18, IL-33, IL-36, а также их сочетаний.

48. Клетка по любому из пп. 44-47, где цитокин представляет собой IL-18.

49. Клетка по любому из пп. 41-48, которая представляет собой иммунореактивную клетку.

50. Клетка по любому из пп. 41-49, которая представляет собой клетку лимфоидной

линии дифференцировки или клетку миелоидной линии дифференцировки.

51. Клетка по любому из пп. 41-50, которая выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, клетки - естественного киллера (NK) и стволовой клетки, из которой могут дифференцироваться лимфоидные клетки.

52. Клетка по любому из пп. 41-51, которая представляет собой Т-клетку.

53. Клетка по п.51 или 52, которая представляет собой цитотоксический Т-лимфоцит (CTL) или регуляторную Т-клетку.

54. Клетка по п.53, где стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.

55. Клетка по п.54, где плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку.

56. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-40.

57. Молекула нуклеиновой кислоты по п.56, которая содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27.

58. Молекула нуклеиновой кислоты по п.56 или 57, которая содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22.

59. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 56-58.

60. Вектор по п.59, который представляет собой γ -ретровирусный вектор.

61. Клетка-хозяин, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 56-58.

62. Клетка-хозяин по п.61, которая представляет собой Т-клетку.

63. Композиция, содержащая клетку по любому из пп. 41-55.

64. Композиция по п.63, которая представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

65. Способ уменьшения опухолевого бремени у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клетки по любому из пп. 41-55 или композиции по п.63 или 64.

66. Способ по п.65, который приводит к уменьшению количества опухолевых клеток, уменьшению размера опухоли и/или к ликвидации опухоли у субъекта.

67. Способ увеличения или продления срока выживания субъекта, имеющего опухоль или новообразование, включающий введение субъекту эффективного количества клетки по любому из пп. 41-55 или композиции по п.63 или 64.

68. Способ лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клетки по любому из пп. 41-55 или композиции по п.63 или 64.

69. Способ по любому из пп. 65-68, где опухоль, или новообразование, выбрана из

группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), множественной миеломы, неходжскинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), глиобластомы, миелодиспластического синдрома (МДС) и хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ).

70. Способ по любому из пп. 65-69, где опухоль или новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

71. Способ получения клетки, содержащей антиген-узнающий рецептор по любому из пп. 1-40, включающий введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген-узнающий рецептор.

72. Набор для уменьшения опухолевого бремени у субъекта, лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования у субъекта, и/или увеличения или продления срока выживания субъекта, имеющего опухоль или новообразование, включающий клетку по любому из пп. 41-55.

73. Набор по п.72, который дополнительно включает письменные инструкции по использованию клетки для уменьшения опухолевого бремени у субъекта, лечения и/или предотвращения опухоли или новообразования у субъекта, и/или увеличения или продления срока выживания субъекта, имеющего опухоль или новообразование.

По доверенности

ФИГ.1

CD371-нацеленные CAR на основе фага

Et.B10L3H_MT_h28Z (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным G4S линкером, L3H, и сигнальным доменом на основе CD28Z)

Et.B10L4H_MT_hBBZ (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 19-аминокислотным G4S линкером, L4H, и сигнальным доменом на основе 4-1BBZ)

Et.B10L4H_MT_h28Z (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 19-аминокислотным G4S линкером, L4H, и сигнальным доменом на основе CD28Z)

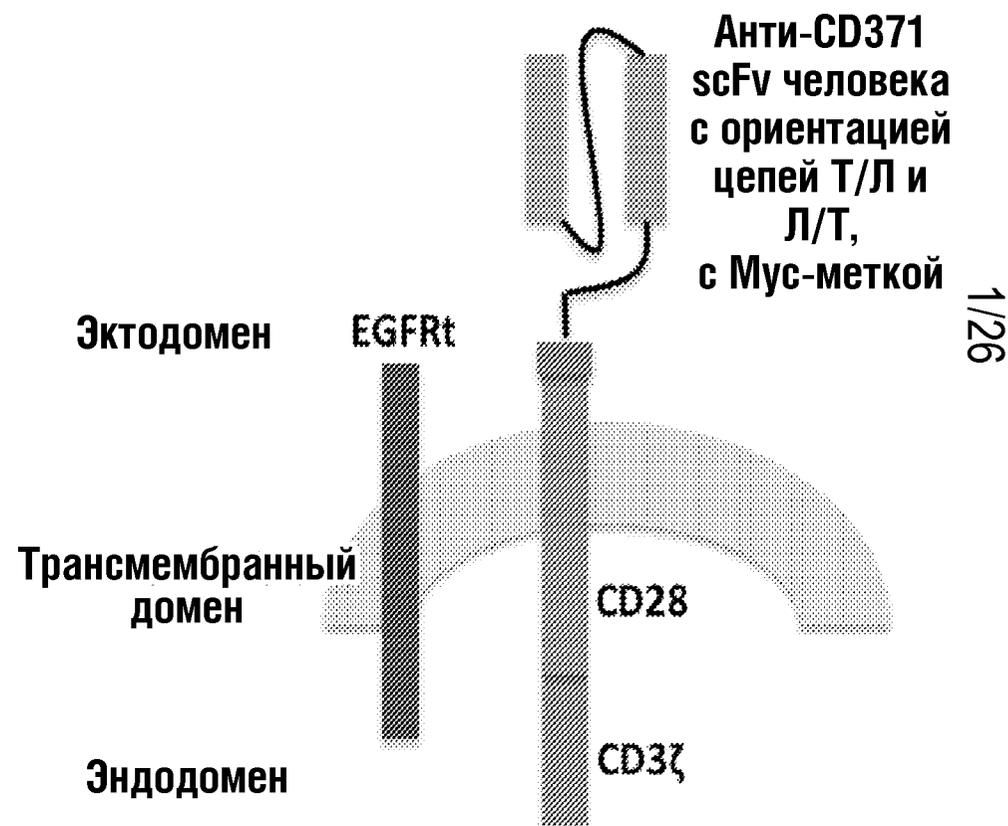
Et.B10H3L_MT_h28Z (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным G4S линкером, H3L, и сигнальным доменом на основе CD28Z)

Et.B10H4L_MT_h28Z (B10, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 19-аминокислотным G4S линкером, H4L, и сигнальным доменом на основе CD28Z)

Et.C3H3L_MT_h28Z (C3, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным G4S линкером, H3L, и сигнальным доменом на основе CD28Z)

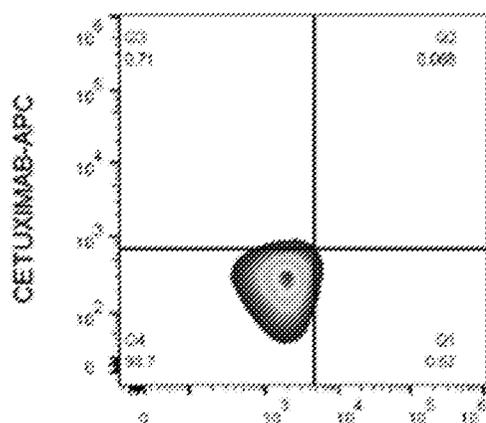
Et.C3L3H_MT_h28Z (C3, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным G4S линкером, L4H, и сигнальным доменом на основе CD28Z)

Et.D6L3H_MT_h28Z (D6, scFv с ориентацией легкая-тяжелая цепь, с 15-аминокислотным G4S линкером, L4H, и сигнальным доменом на основе CD28Z)

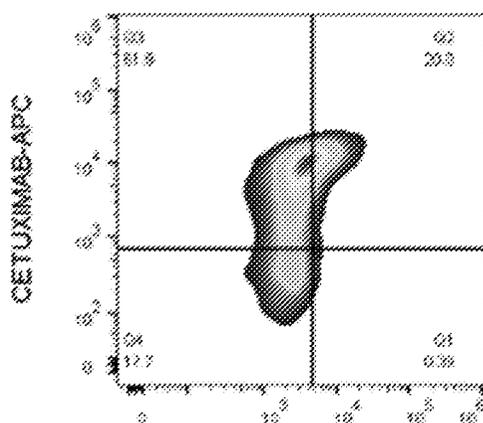


ФИГ.2

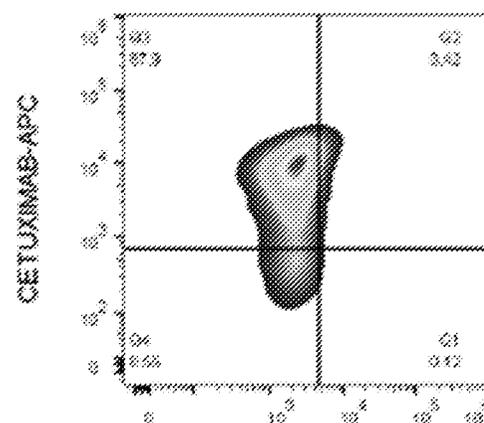
Конструкции CAR с EGFR и MYC-меткой



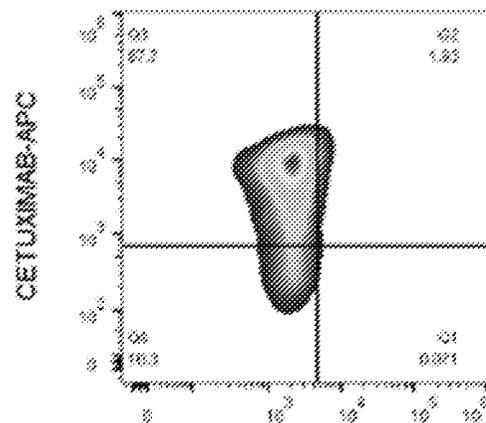
9B11-PE (Ат против MYC-метки)
ЧТ-клетки 9B11ре/CTXarc 595.LMD



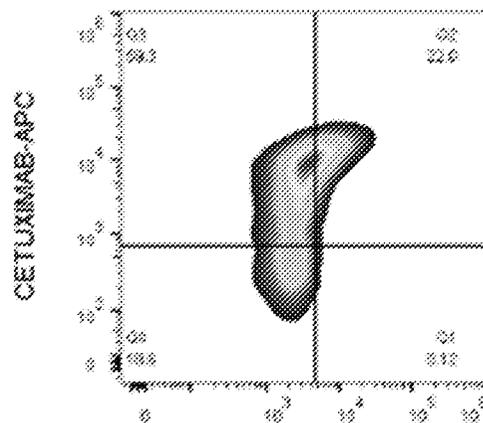
9B11-PE (Ат против MYC-метки)
26dR E1B10L4HmtDEL 797.L 596.LMD



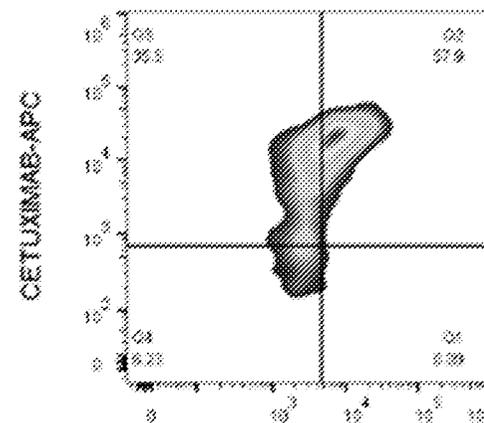
9B11-PE (Ат против MYC-метки)
26dR Etah19h28Z 798.LMD 597.LMD



9B11-PE (Ат против MYC-метки)
26dR E1C1Hvh28Z 799.LMD 598.LMD



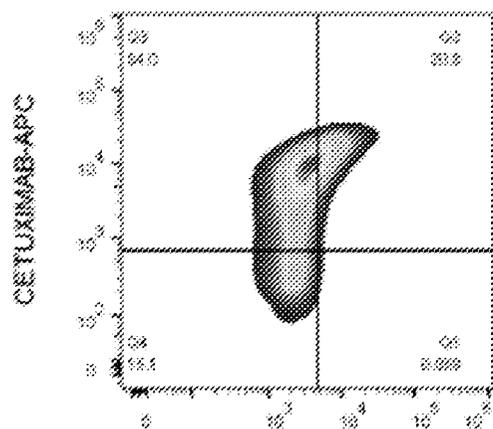
9B11-PE (Ат против MYC-метки)
26dR E1B10H3Lmt28Z 800.L 599.LMD



9B11-PE (Ат против MYC-метки)
26dR E1B10H4Lmt28Z 801.L 600.LMD

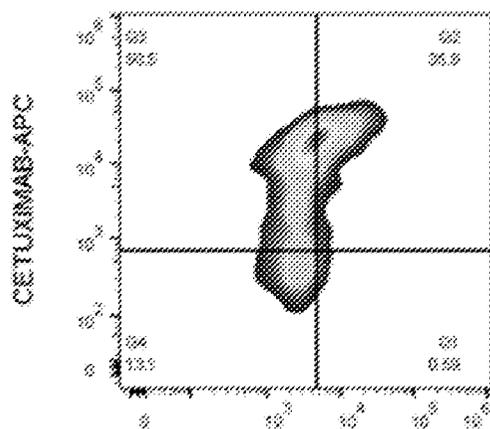
ФИГ.2, продолжение

Конструкции CAR с EGFR и MYC-меткой



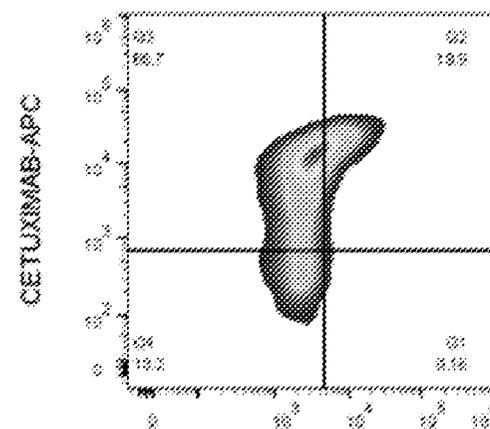
9B11-PE (Ат против MYC-метки)

26dR E1B10H3LmtBBZ 802.L 601.LMD



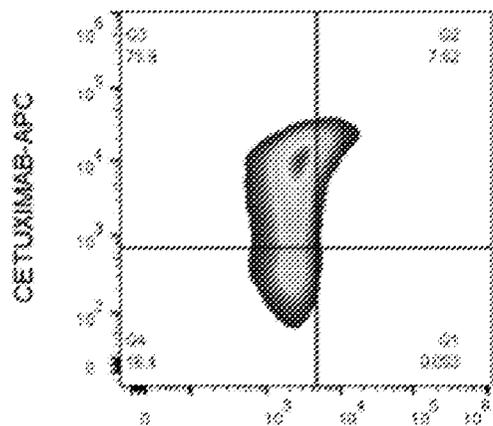
9B11-PE (Ат против MYC-метки)

26dR E1B10L3Hmt28Z 803.L 602.LMD



9B11-PE (Ат против MYC-метки)

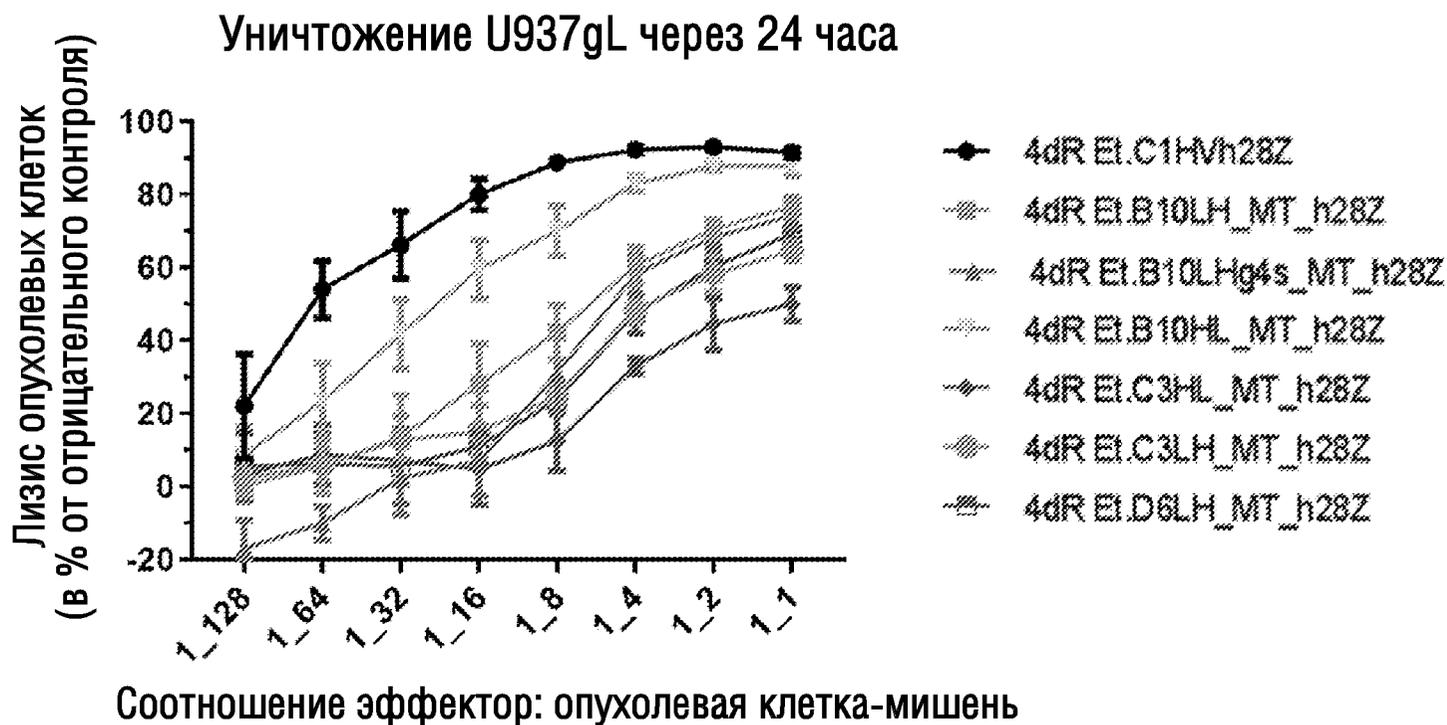
26dR E1B10L4Hmt28Z 604.L 603.LMD



9B11-PE (Ат против MYC-метки)

26dR E1B10L4HmtBBZ 805.L 604.LMD

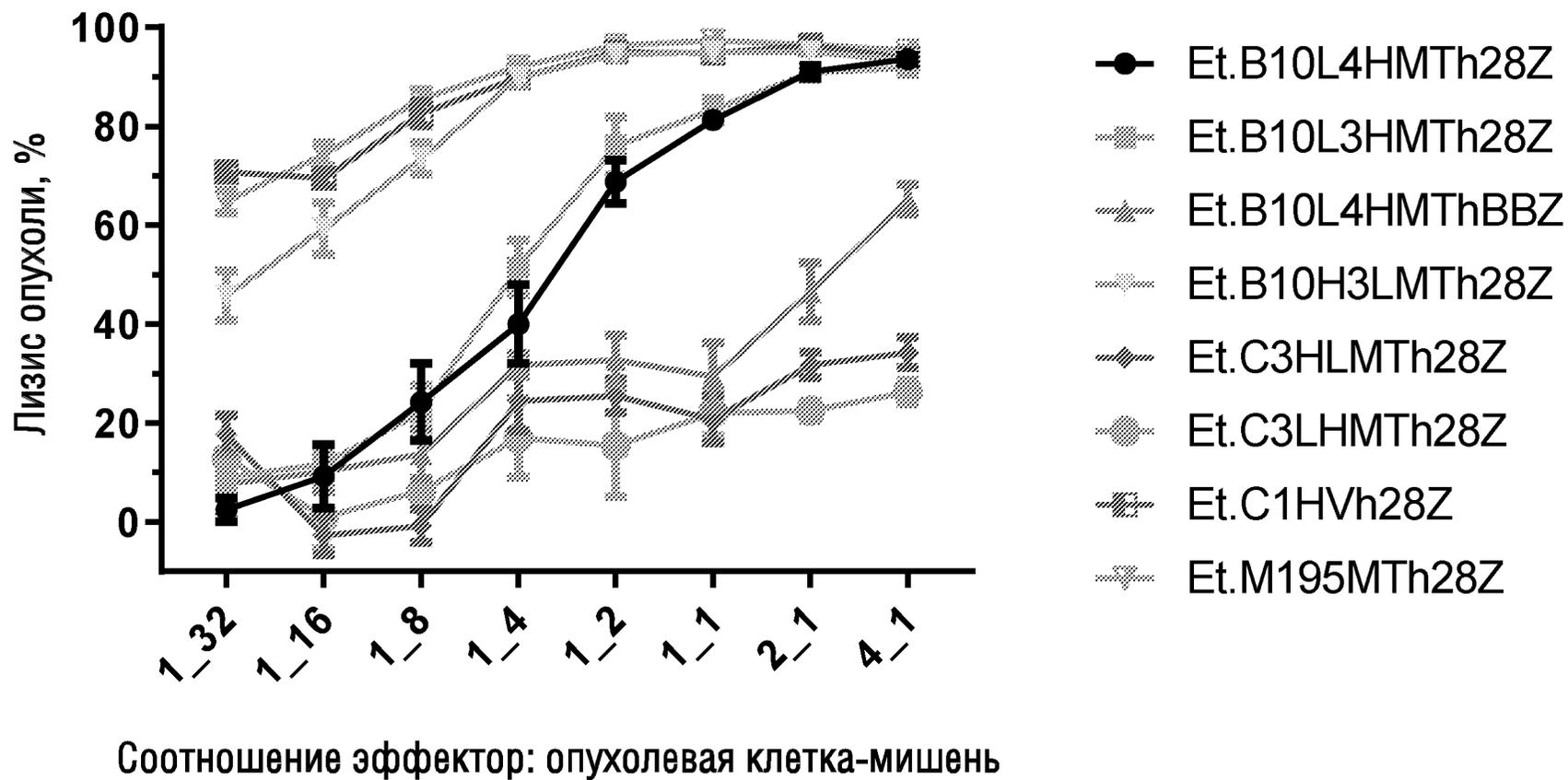
ФИГ.3



	Тест множественных сравнений Даннетта	Сред. разница	95,00% ДИ для разницы	Значимо?	Резюме	Скорректир. Р-значение
1_1						
4dR Et.C1HLVh28Zvs. 4dR Et.B_LH_MT_h28Z		14.75	2.322 to 27.18	Да	*	0.0128
4dR Et.C1HLVh28Zvs. 4dR Et.B_LHg4s_MT_h28Z		17.25	4.822 to 29.68	Да	**	0.0024
4dR Et.C1HLVh28Zvs. 4dR Et.B_HL_MT_h28Z		3.750	-8.678 to 16.18	Нет	ns	0.9305
4dR Et.C1HLVh28Zvs. 4dR Et.C_HL_MT_h28Z		41.50	29.07 to 53.93	Да	****	<0.0001
4dR Et.C1HLVh28Zvs. 4dR Et.C_LH_MT_h28Z		27.00	14.57 to 39.43	Да	****	<0.0001
4dR Et.C1HLVh28Zvs. 4dR Et.D_LH_MT_h28Z		22.25	9.822 to 34.68	Да	****	<0.0001

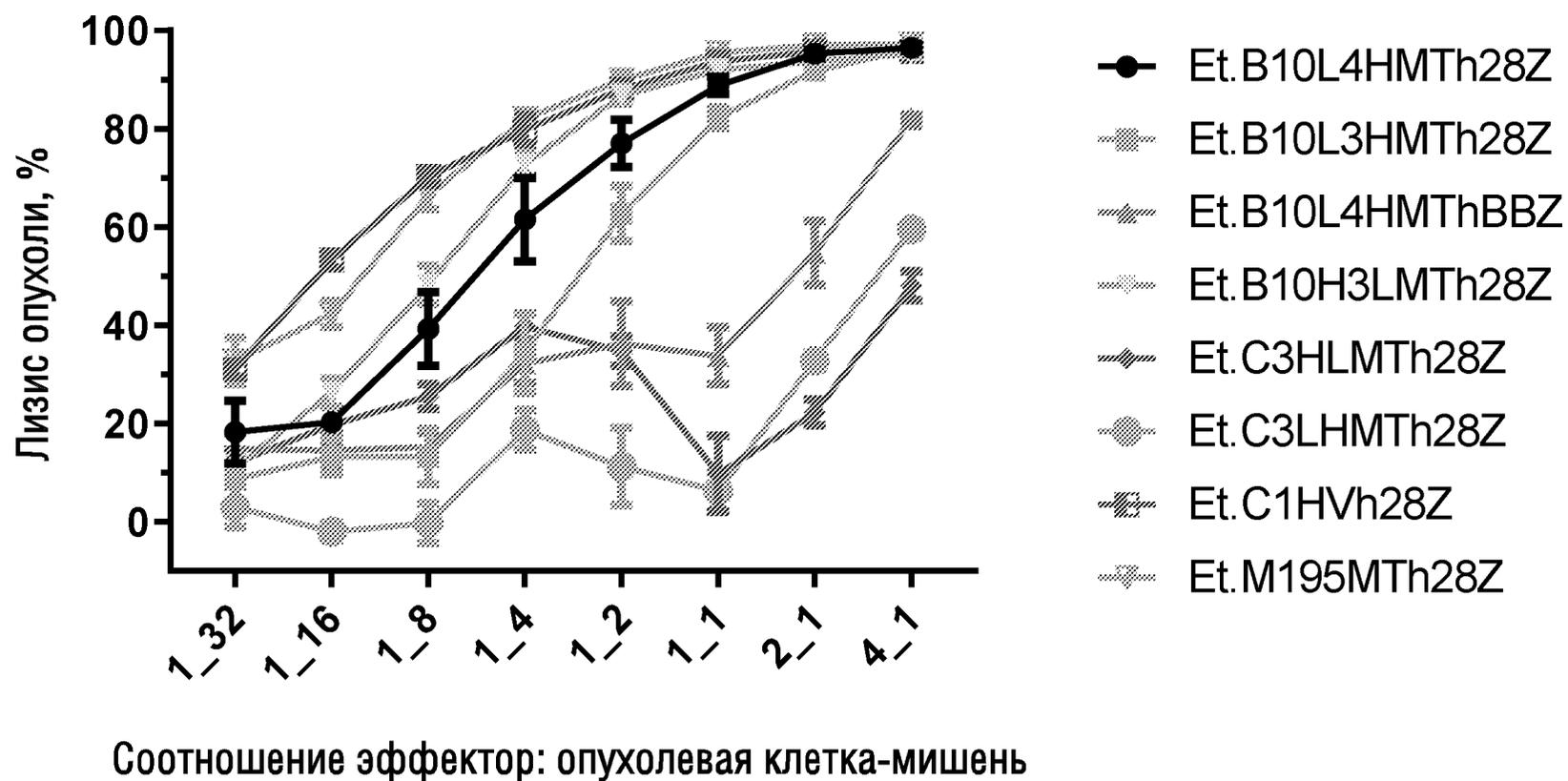
ФИГ.4

Уничтожение U937gL через 24 часа (донор С)



ФИГ.5

Уничтожение U937gL через 24 часа (донор D)



ФИГ.6

Рекурсивная стимуляция CAR Т-клеток донора С опухолевыми клетками-мишенями при соотношении Э:М, составляющем 1:12,5



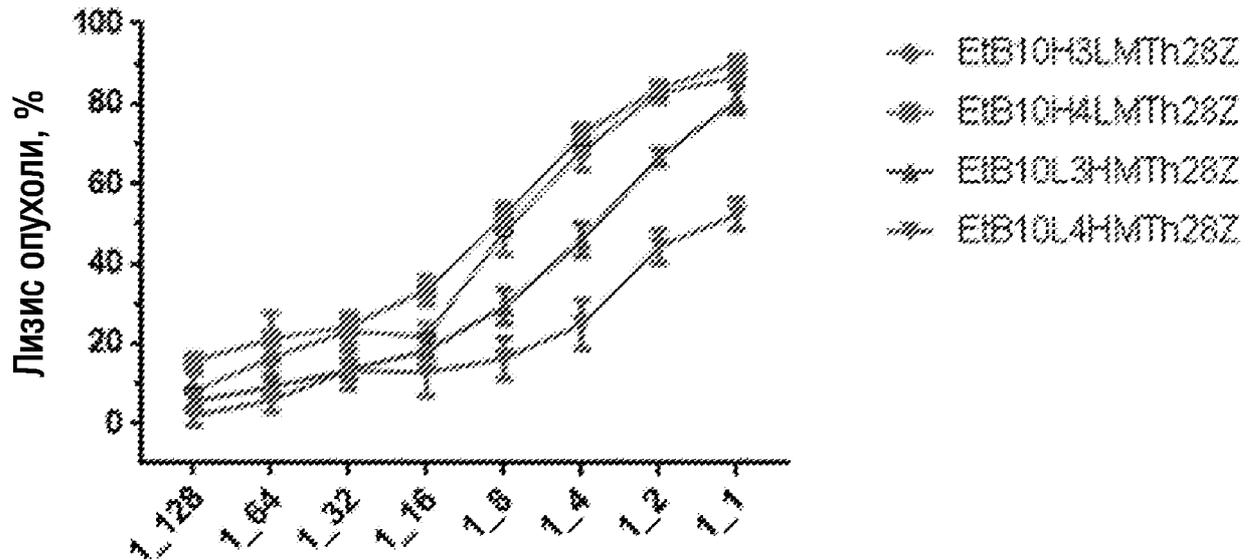
ФИГ.7

Рекурсивная стимуляция CAR T-клеток донора D опухолевыми клетками-мишенями при соотношении Э:М, составляющем 1:12,5



ФИГ.8А

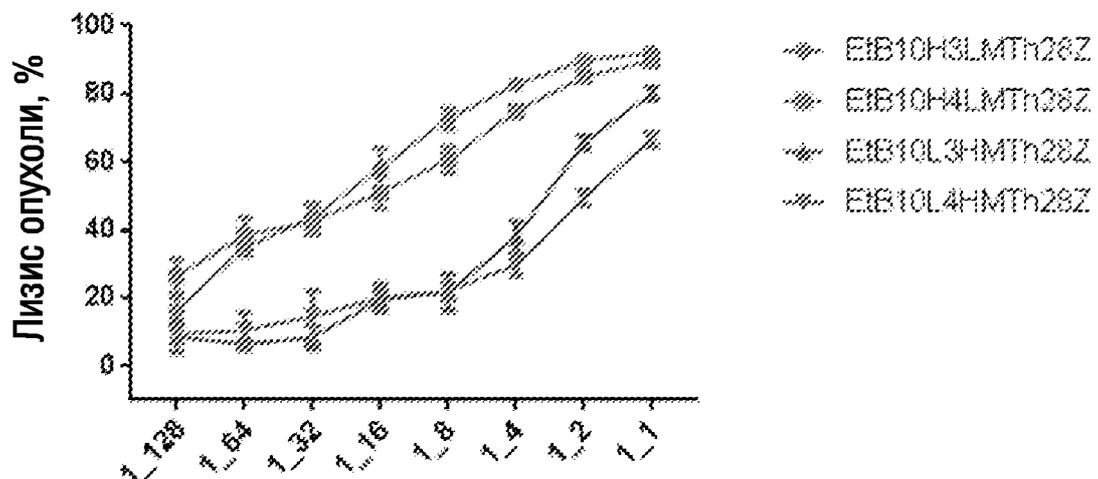
Уничтожение U937gL через 24 часа (донор А)



Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

ФИГ.8В

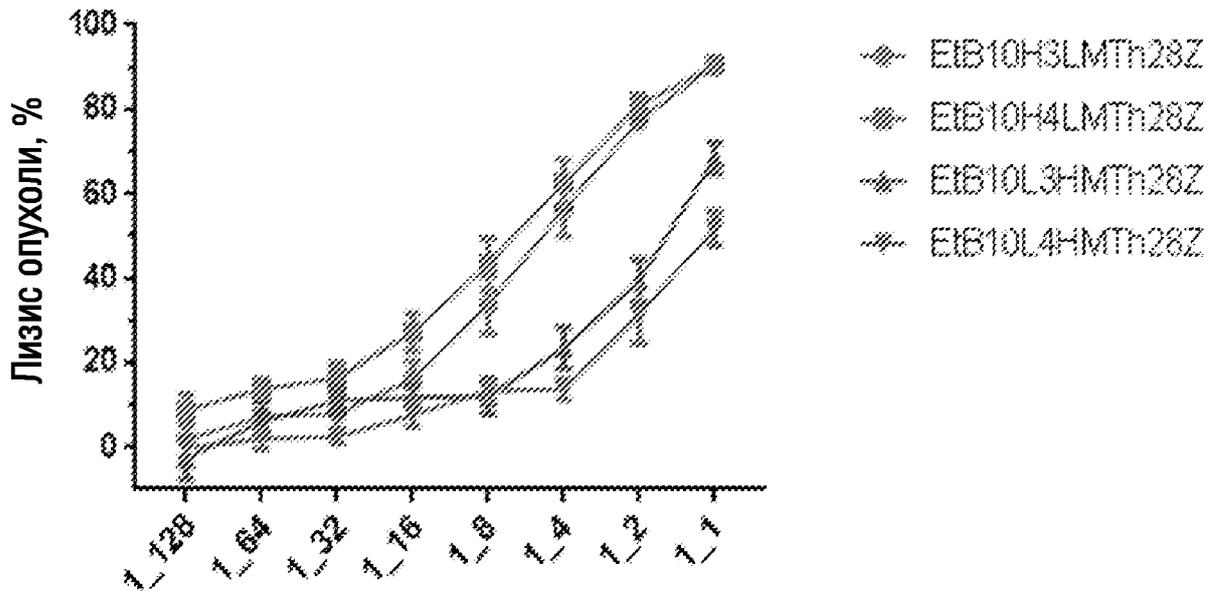
Уничтожение U937gL через 24 часа (донор В)



Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

ФИГ.9А

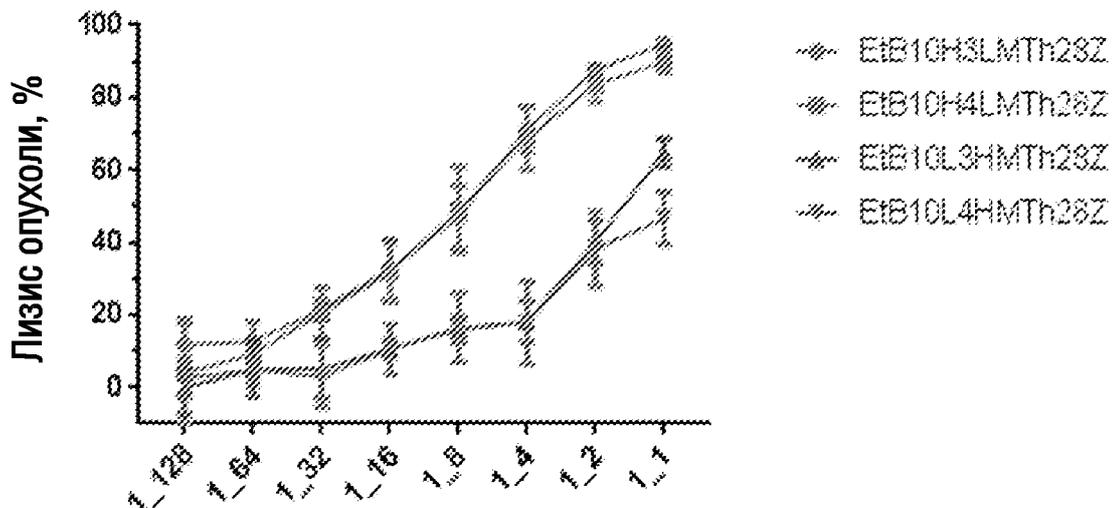
Уничтожение HL60gL через 24 часа (донор А)



Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

ФИГ.9В

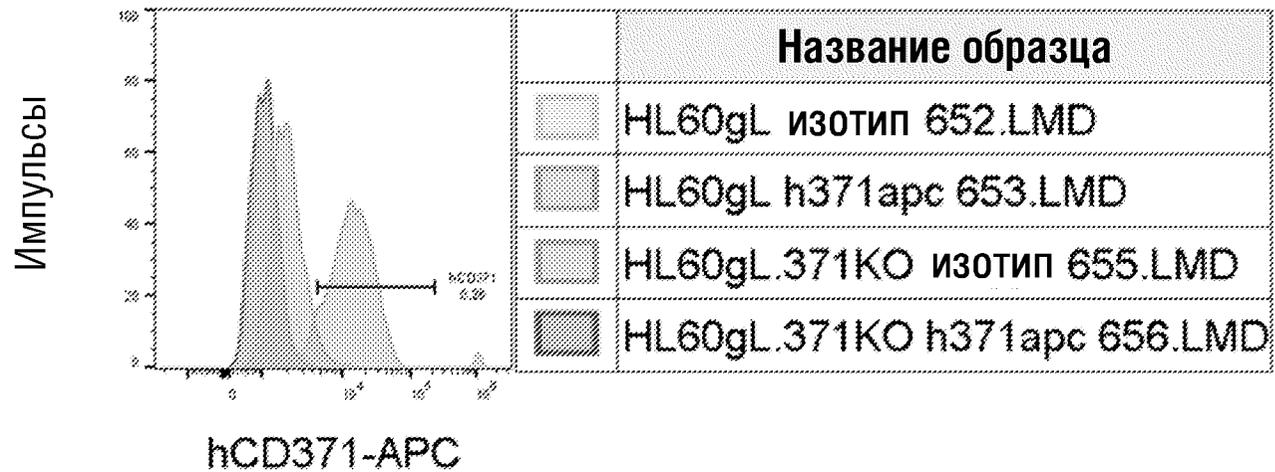
Уничтожение HL60gL через 24 часа (донор В)



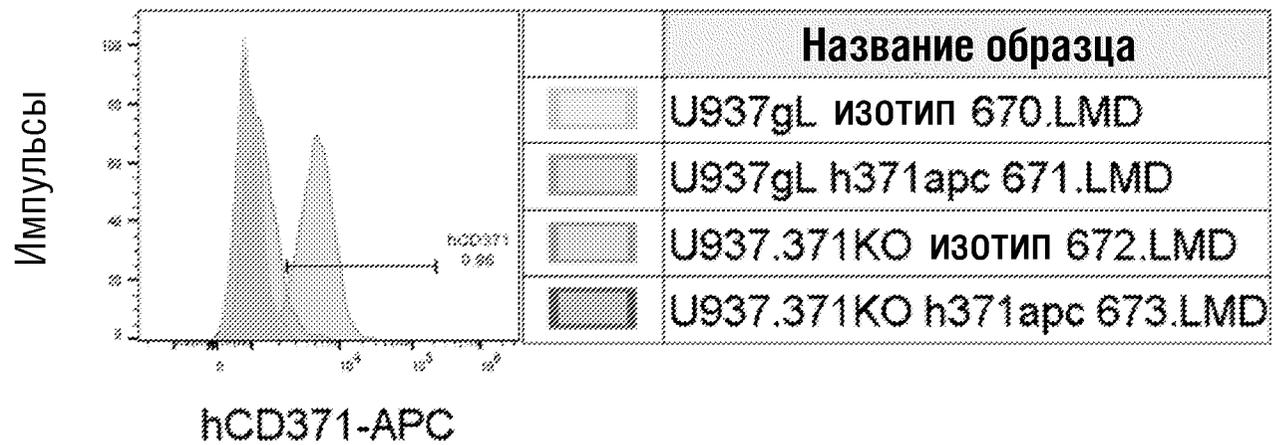
Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

ФИГ.10А

Получение при помощи CRISPR линий клеток с нокаутом CD371 человека

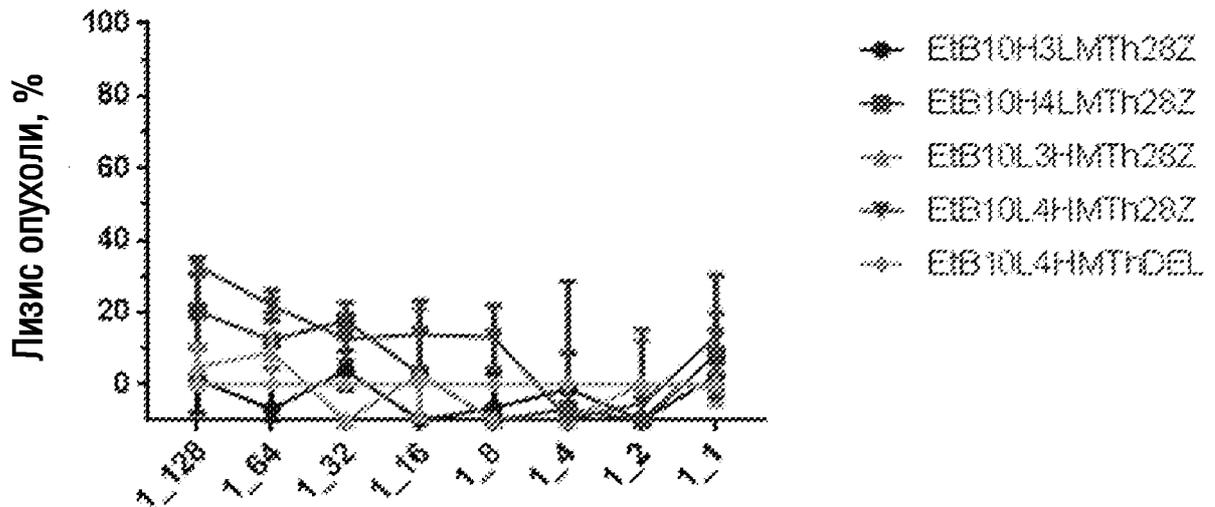


ФИГ.10В



ФИГ.11А

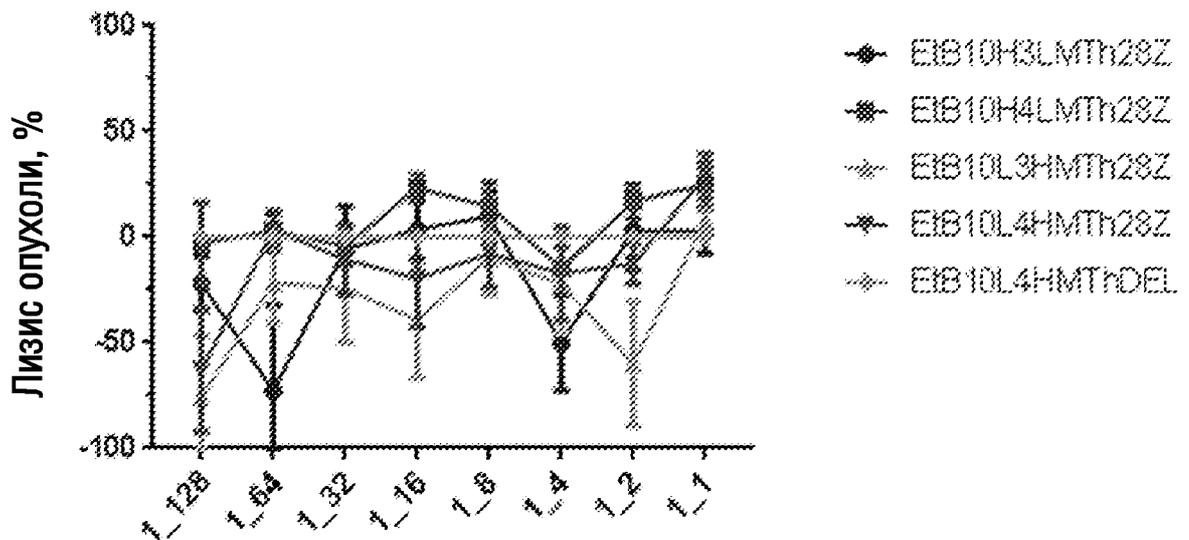
Уничтожение U937RFPсупр.371КО через 24 часа (донор А)



Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

ФИГ.11В

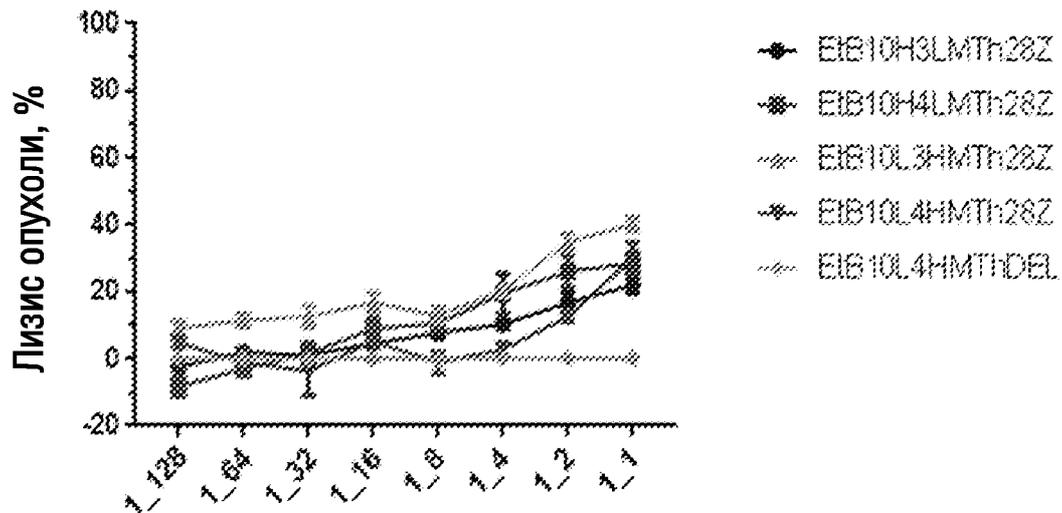
Уничтожение U937RFPсупр.371КО через 24 часа (донор В)



Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

ФИГ.12А

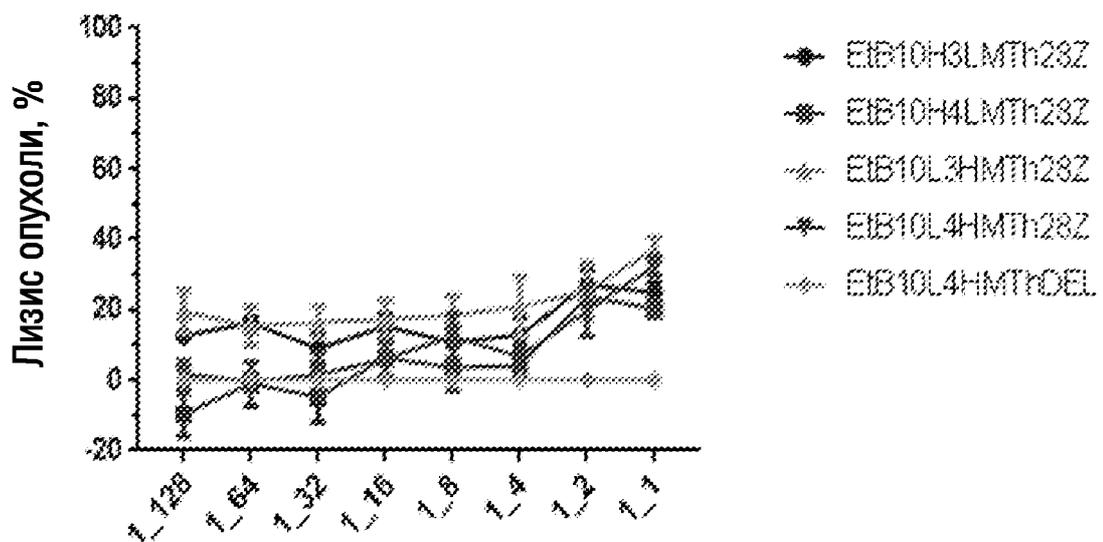
Уничтожение HL60gL.371КО через 24 часа (донор А)



Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

ФИГ.12В

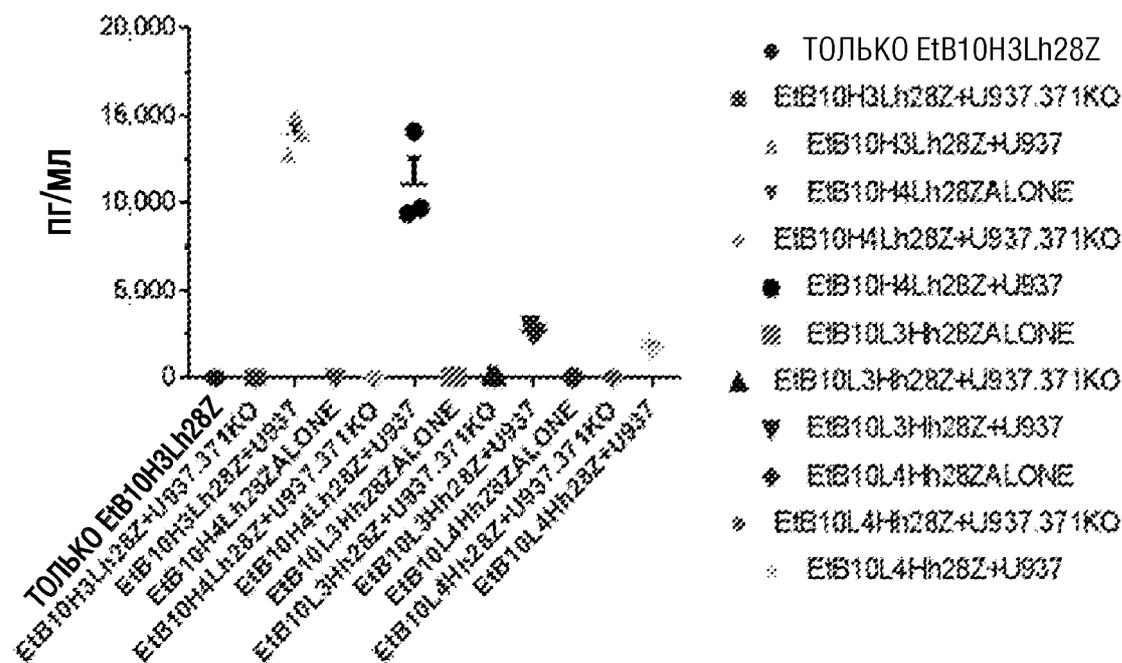
Уничтожение HL60gL.371КО через 24 (донор В)



Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

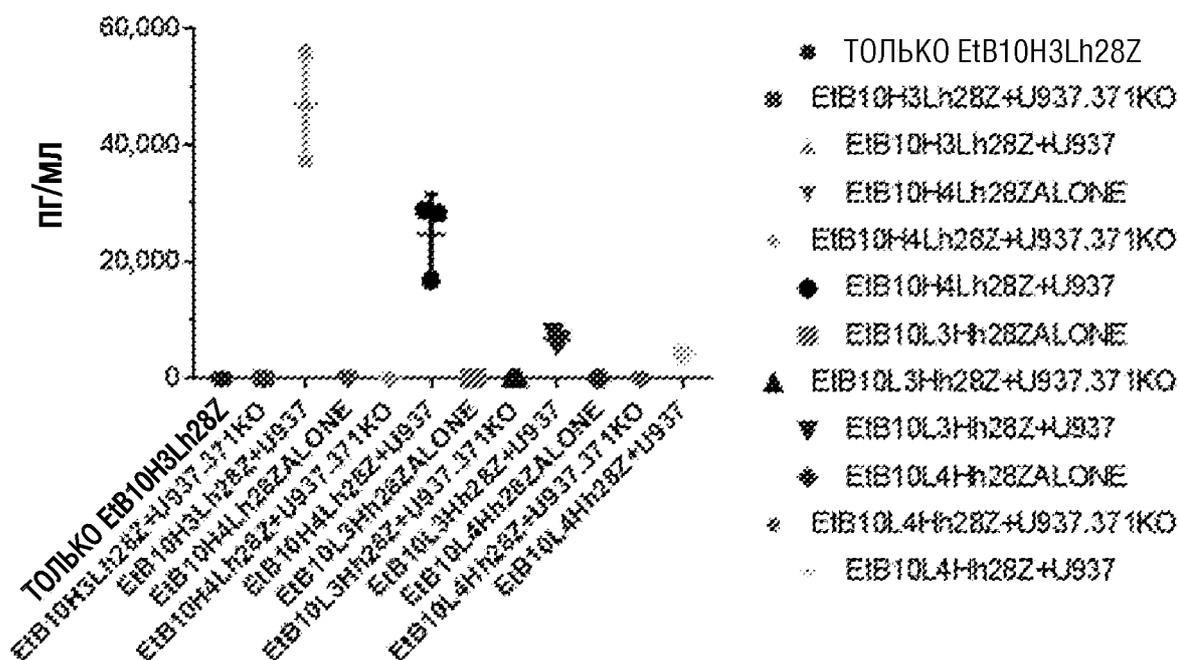
ФИГ.13А

Секреция интерферона-гамма через 24 часа (донор А)



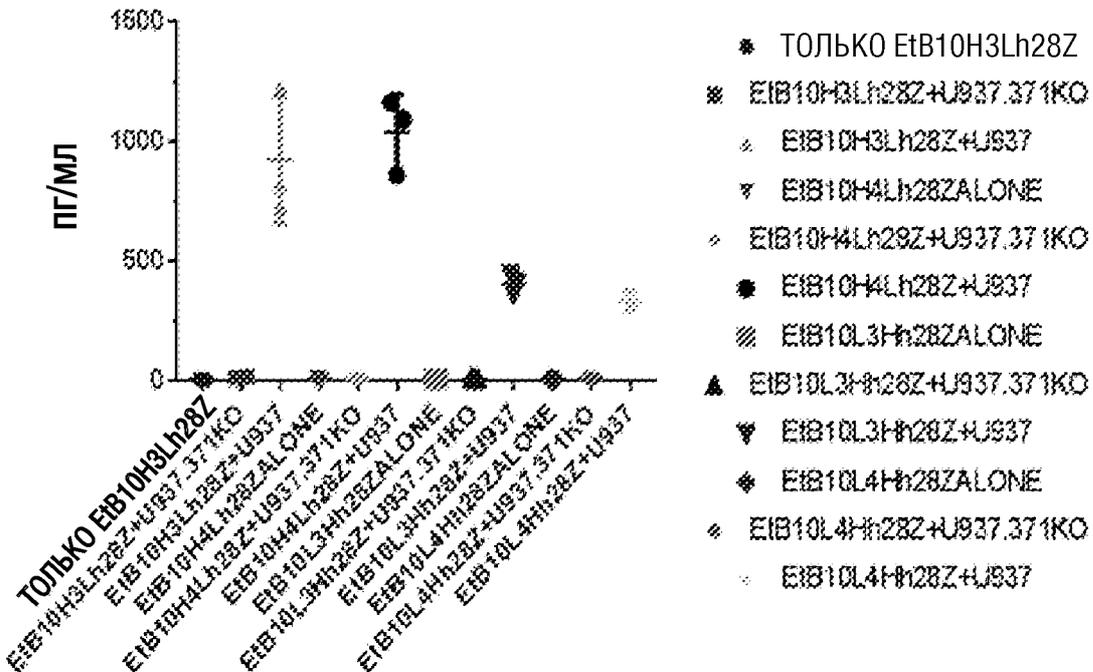
ФИГ.13В

Секреция интерферона-гамма через 24 часа (донор В)



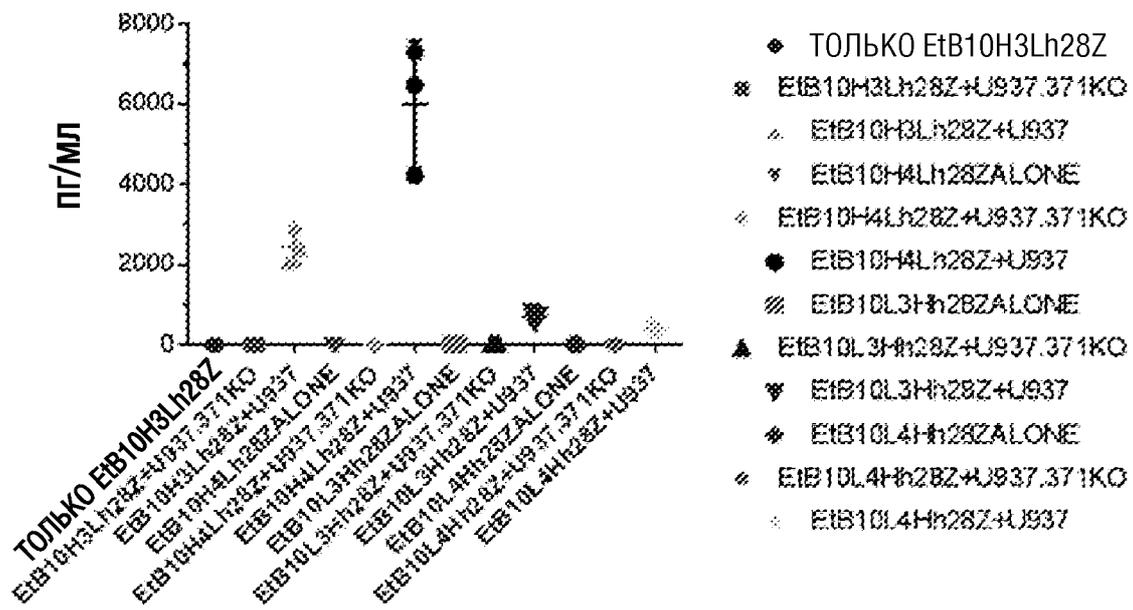
ФИГ.14А

Секреция интерлейкина-2 через 24 часа (донор А)



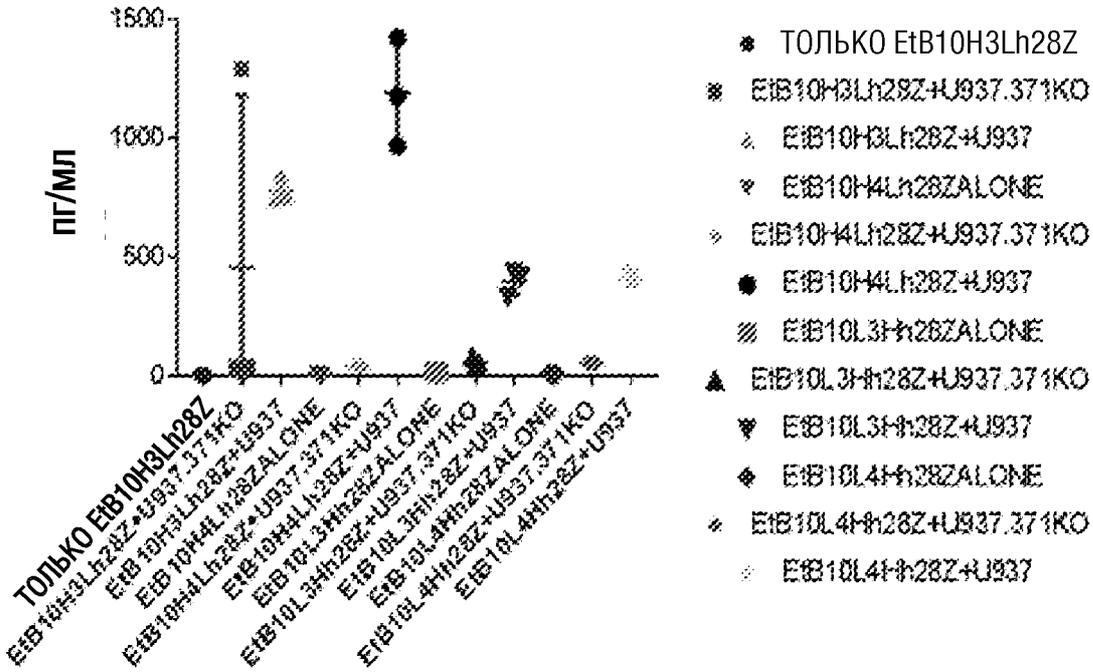
ФИГ.14В

Секреция интерлейкина-2 через 24 часа (донор В)



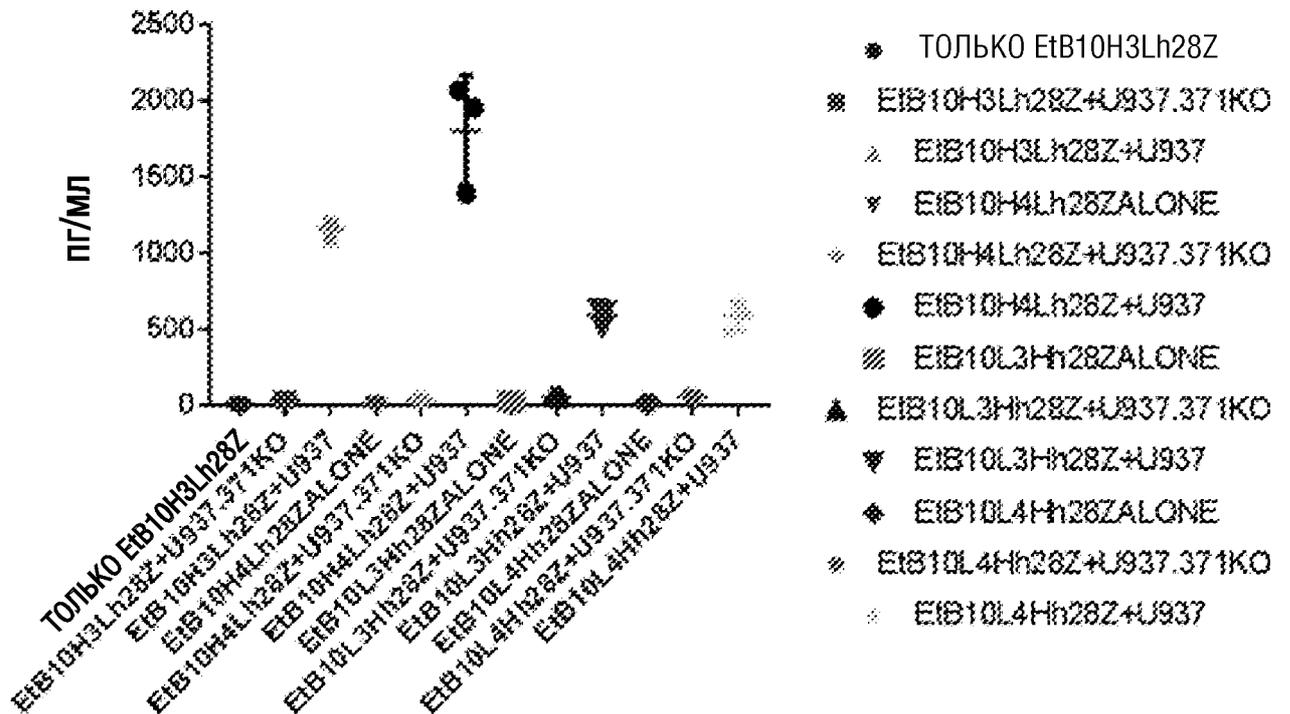
ФИГ.15А

Секреция TNF-альфа через 24 часа (донор В)



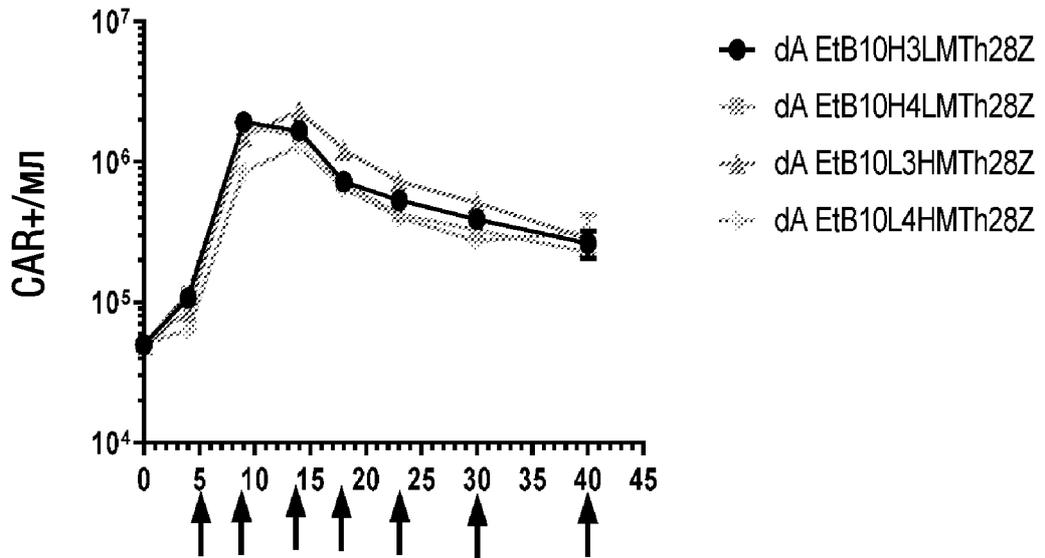
ФИГ.15В

Секреция TNF-альфа через 24 часа (донор В)



ФИГ.16А

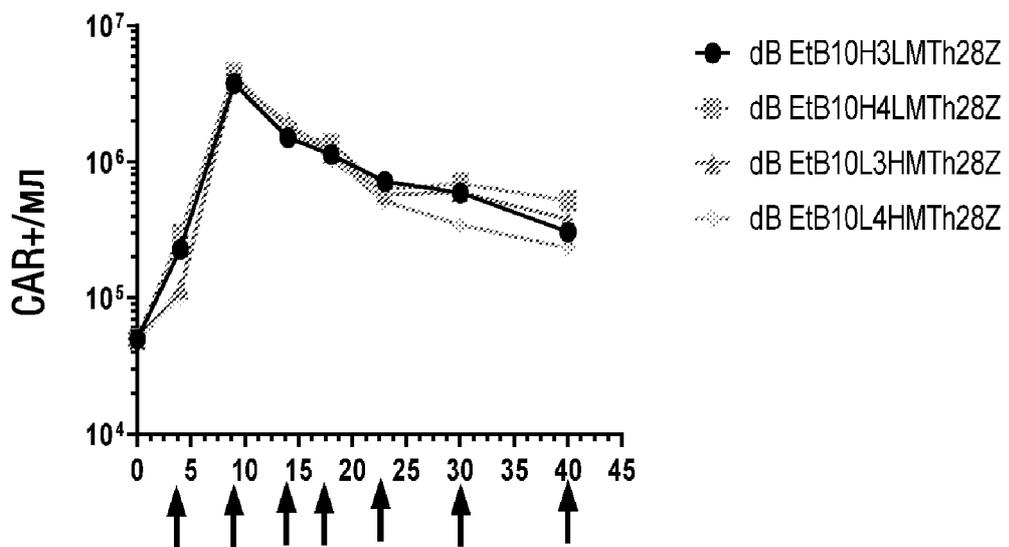
Рекурсивная стимуляция CAR Т-клеток донора А опухолевыми клетками-мишенями при соотношении Э:М, составляющем 1:5



День совместного культивирования

ФИГ.16В

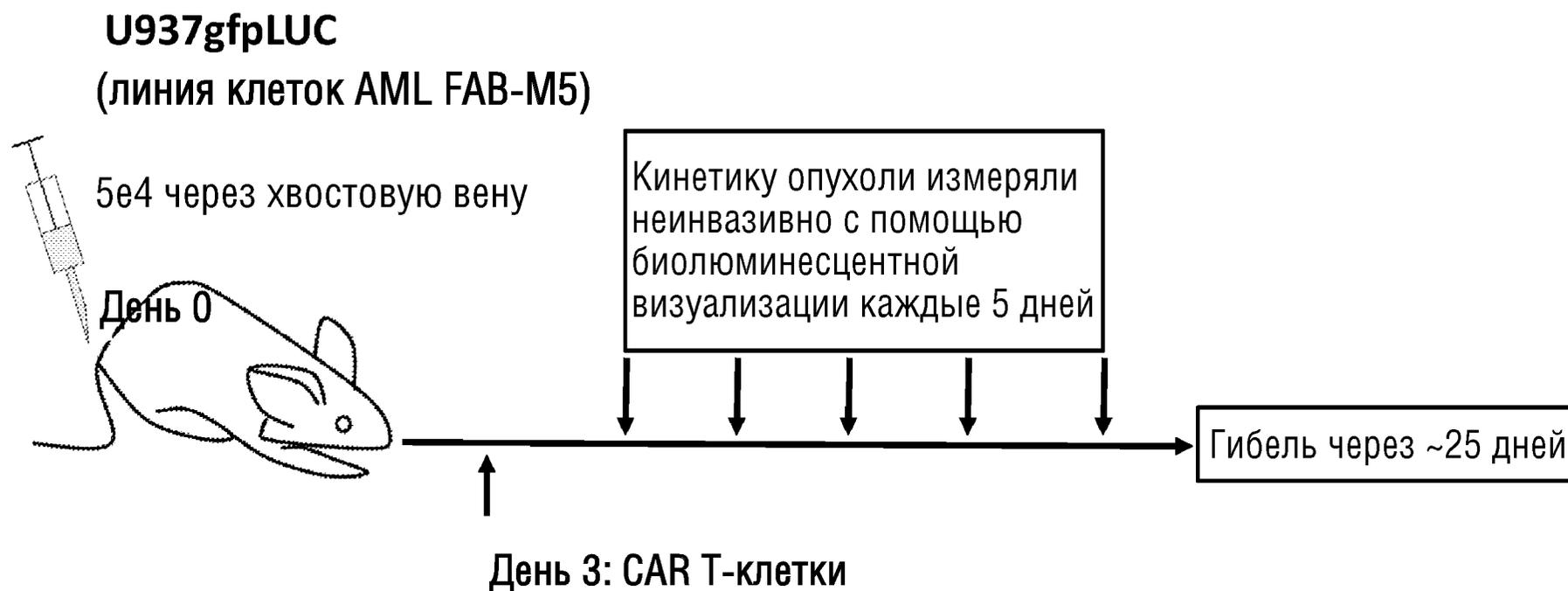
Рекурсивная стимуляция CAR Т-клеток донора В опухолевыми клетками-мишенями при соотношении Э:М, составляющем 1:5



День совместного культивирования

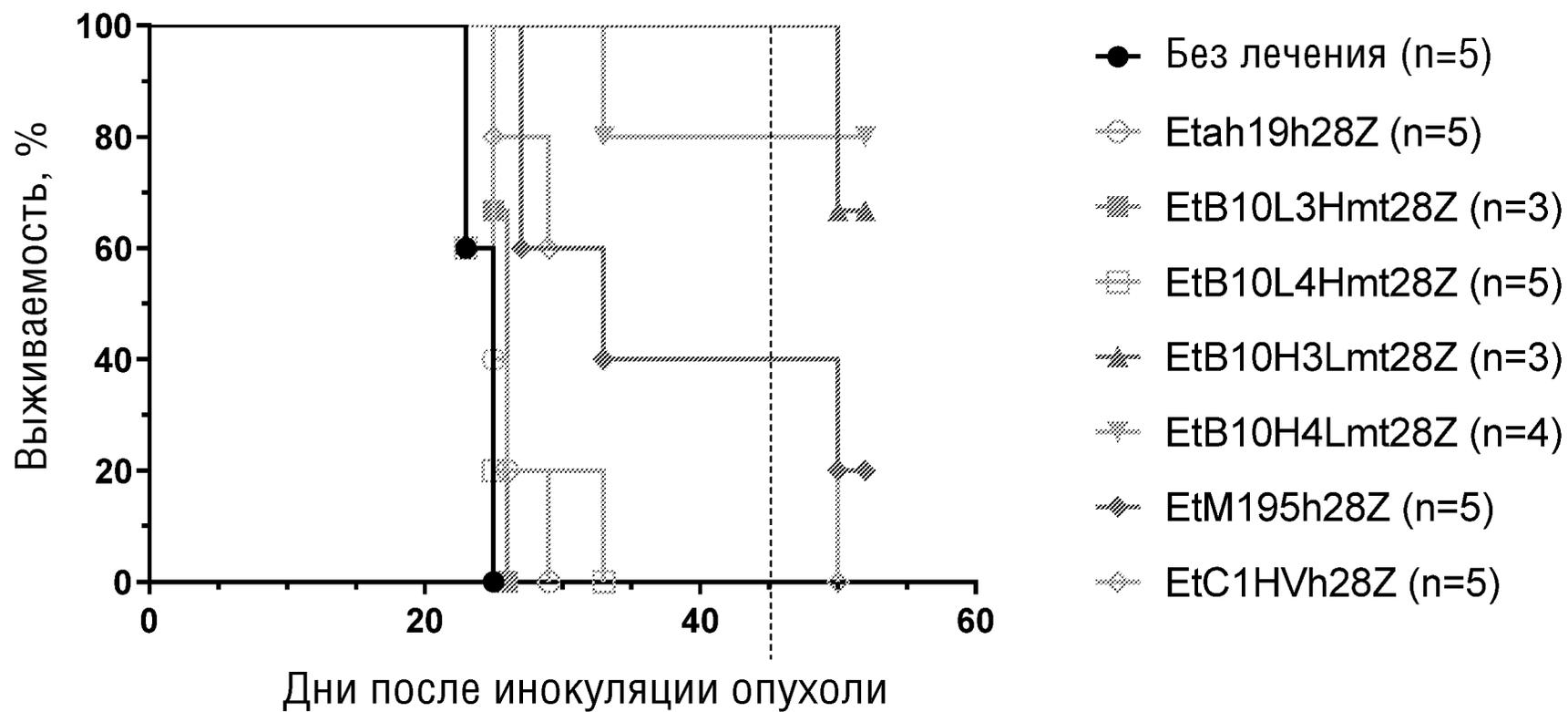
ФИГ.17

Модель ксенотрансплантата ОМЛ



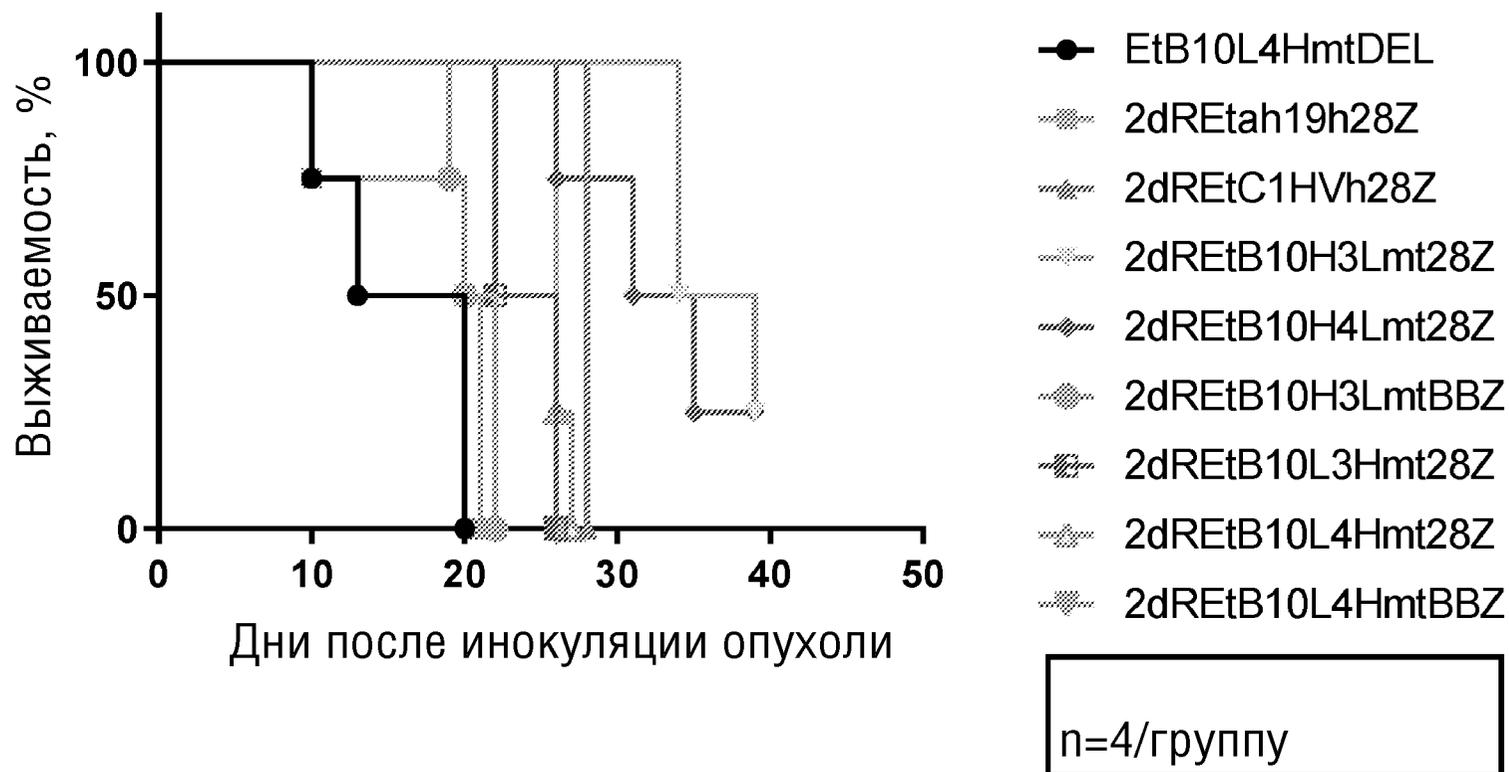
ФИГ.18

5e4 U937gL (день 0) -> 1.25e6 CAR T-клеток (день 3)



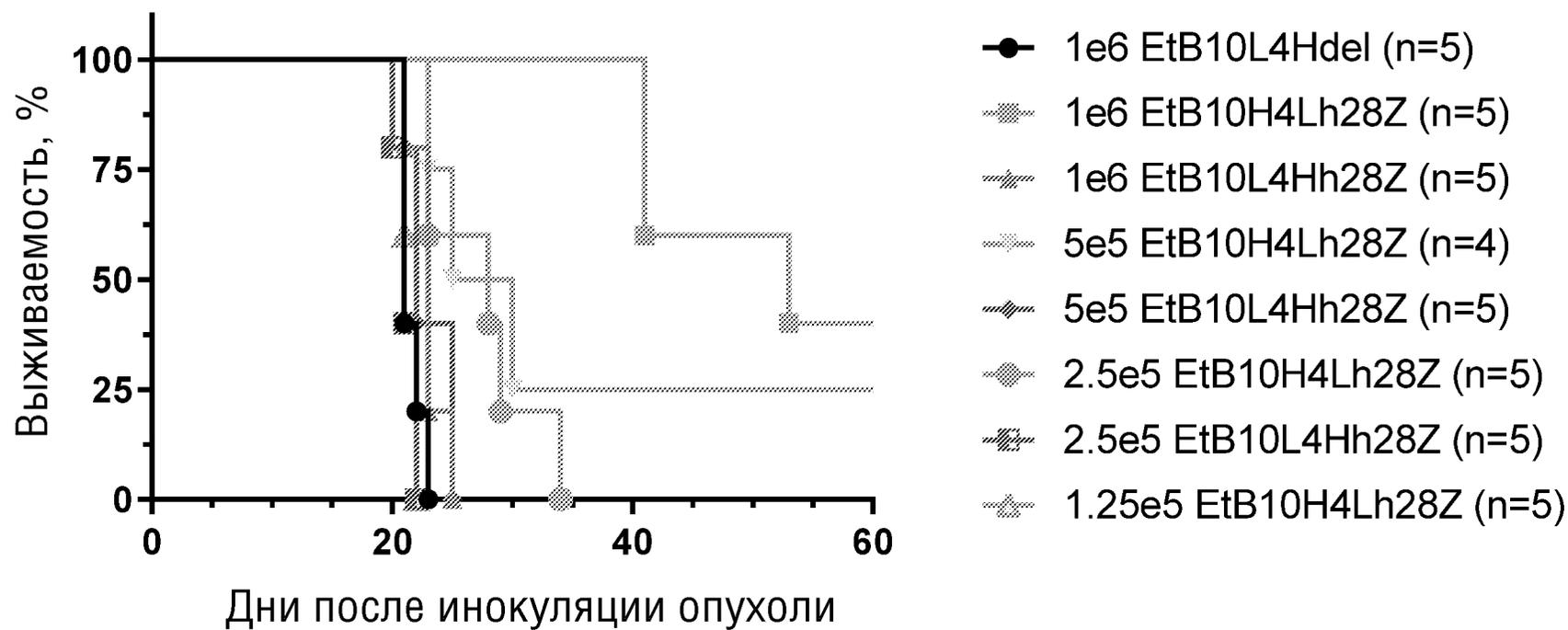
ФИГ.19

5e4 U937gL (день 0) -> 1.25E6 CAR+ Т-клеток (день 3)



ФИГ.20

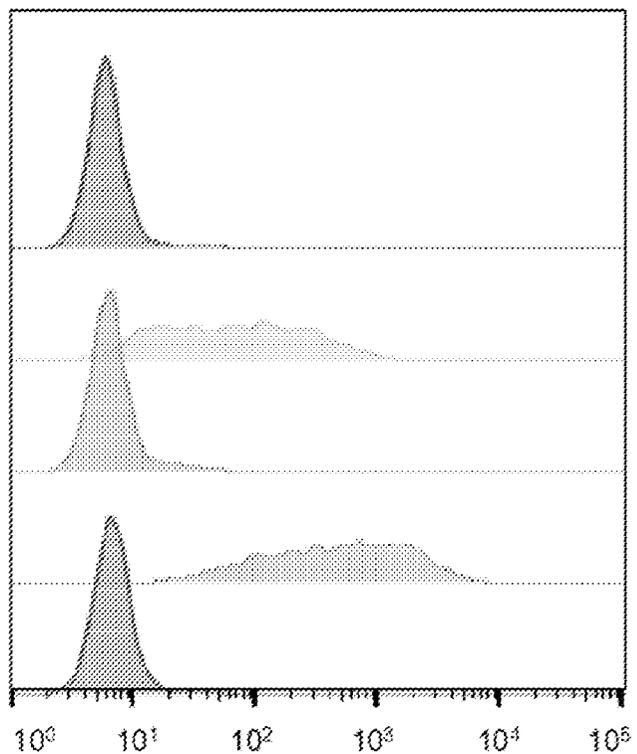
5e4 U937gL (день 0) -> CAR T-клетки (день 3)



ФИГ.21

HEK293-CD371

scFv

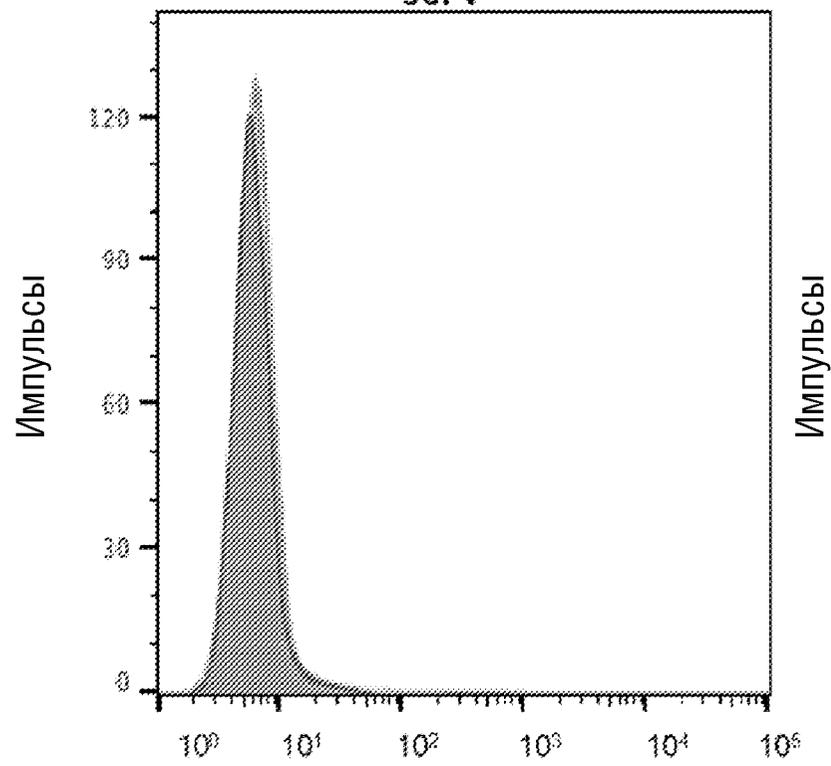


YEL-B-HLin :: Флуоресценция Yellow-B (YEL-B-HLIN)

	Название подгруппы	Медиана: YEL-B-HLin
▨	1B10 Scfv VH_VL	5.94
▨	1B10 Scfv VL_VH	66.1
▨	анти-his	6.34
▨	анти-чCD371	474
▨	анти-мышинные	6.69

HEK293 ДТ

scFv

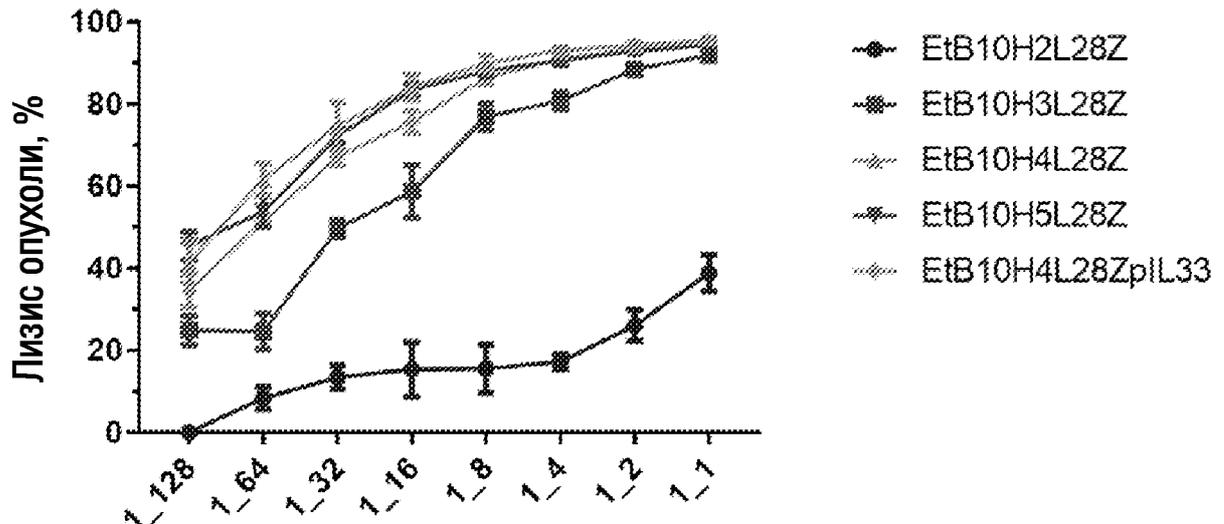


YEL-B-HLin :: Флуоресценция Yellow-B (YEL-B-HLIN)

	Название подгруппы	Медиана: YEL-B-HLin
▨	1B10 Scfv VH_VL	5.89
▨	1B10 Scfv VL_VH	5.84
▨	анти-his	6.11
▨	анти-чCD371	6.29
▨	анти-мышинные	6.36

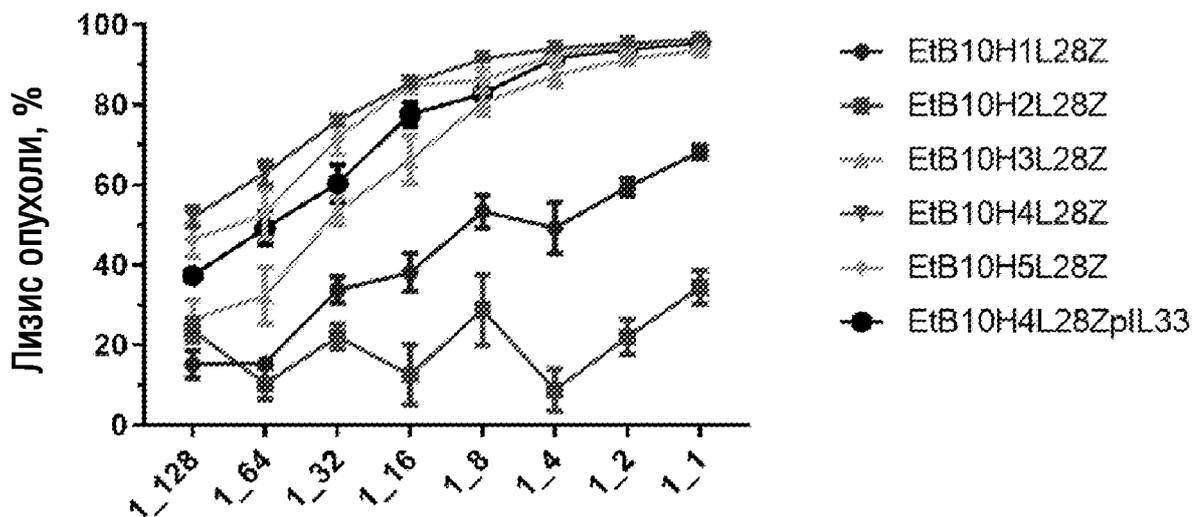
ФИГ.22

Уничтожение U937gL через 24 часа (донор А)



Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

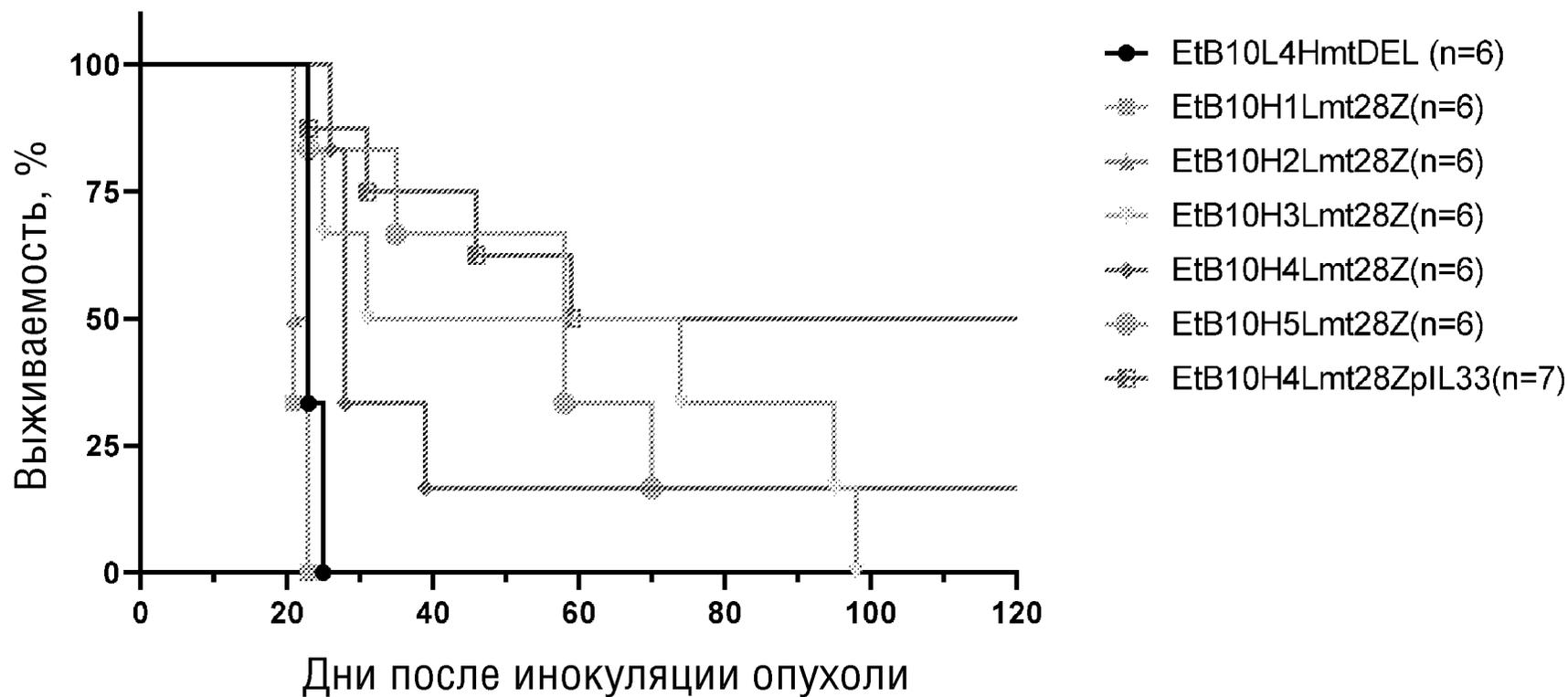
Уничтожение U937gL через 24 часа (донор В)



Соотношение эффектор: опухолевая клетка-мишень

ФИГ.23

5e4 U937gL (день 0) -> 5e5 CAR+ Т-клеток (день 3)

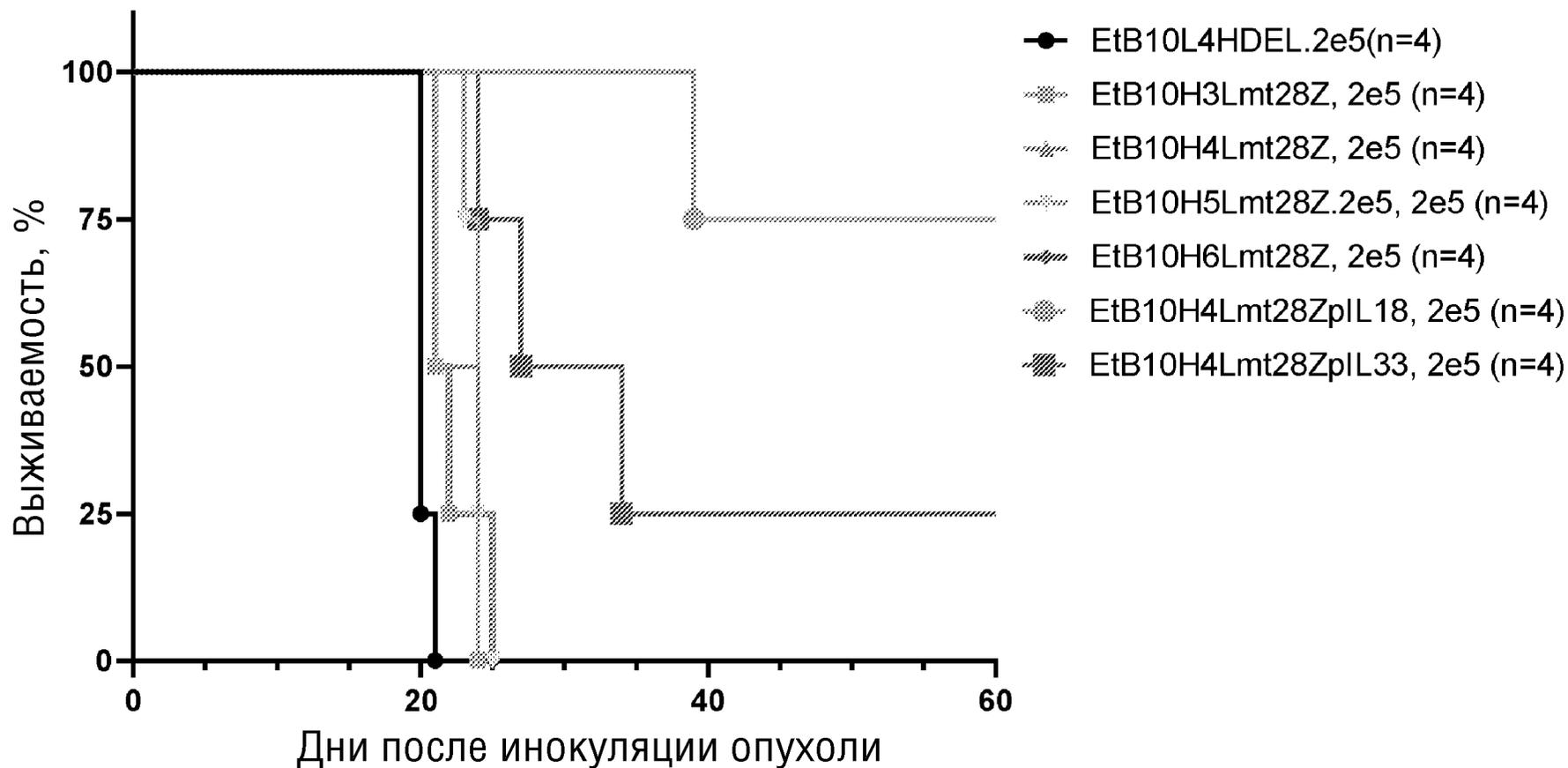


24/26

	EtB10L4HmtDEL (n=6)	EtB10H1Lmt28Z(n=6)	EtB10H2Lmt28Z(n=6)	EtB10H3Lmt28Z(n=6)
Средняя выживаемость	23	21	22	52.5
	EtB10H4Lmt28Z(n=6)	EtB10H5Lmt28Z(n=6)	EtB10H4Lmt28ZpIL33(n=7)	
	28	58	98	

ФИГ.24

5e4 U937gL (день 0) -> 2e5 CAR+ Т-клеток (день 3)



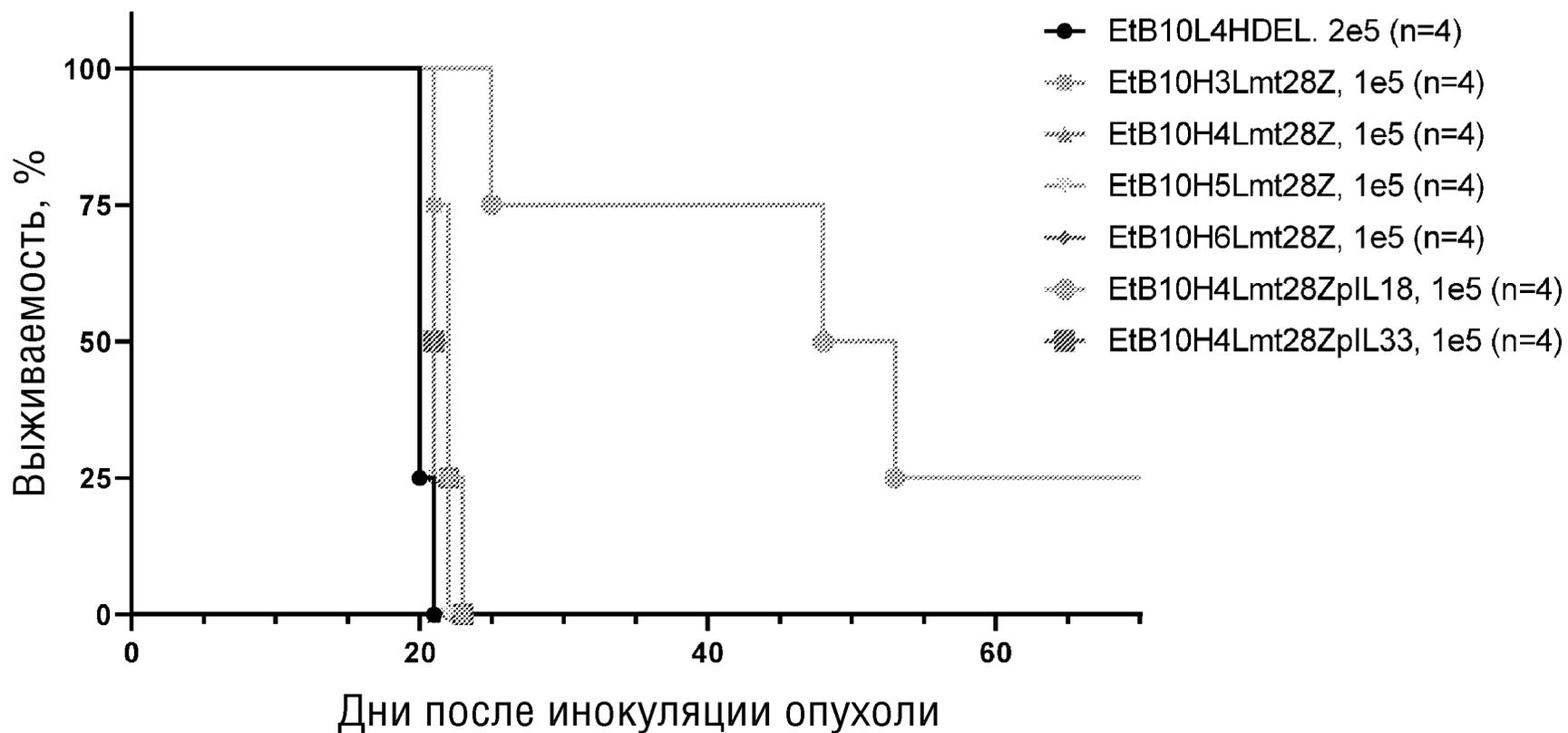
25/26

	EtB10L4HDEL.2e5(n=4)	EtB10H3Lmt28Z, 2e5 (n=4)	EtB10H4Lmt28Z, 2e5 (n=4)	EtB10H5Lmt28Z.2e5, 2e5 (n=4)
Сред. выживаемость	20	21.5	22.5	24

EtB10H6Lmt28Z, 2e5 (n=4)	EtB10H4Lmt28ZpIL18, 2e5 (n=4)	EtB10H4Lmt28ZpIL33, 2e5 (n=4)
21.5	Не определено	30.5

ФИГ.25

5e4 U937gL (день 0) -> 1e5 CAR+ Т-клеток (день 3)



26/26

	EtB10L4HDEL. 2e5 (n=4)	EtB10H3Lmt28Z, 1e5 (n=4)	EtB10H4Lmt28Z, 1e5 (n=4)	EtB10H5Lmt28Z, 1e5 (n=4)
Средняя выживаемость	20	22	21	21
	EtB10H6Lmt28Z, 1e5 (n=4)	EtB10H4Lmt28ZpIL18, 1e5 (n=4)	EtB10H4Lmt28ZpIL33, 1e5 (n=4)	
	21	50.5	21.5	