

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291476** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.10

(22) Дата подачи заявки
2020.11.17

(51) Int. Cl. **C07K 14/725** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПРОТИВ CD79, КЛЕТКИ CAR-T И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/936,662**

(32) **2019.11.18**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2020/060826**

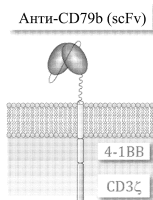
(87) **WO 2021/099944 2021.05.27**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Ганешан Раджкumar (US), Ласорса
Элена, Филиппар Ульрике (BE)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В настоящем изобретении предложены химерные антигенные рецепторы (CAR), которые специфически нацелены на кластер дифференциации белка 79В (CD79b) и иммунореактивные клетки, содержащие такие CAR, для лечения рака.



A1

202291476

202291476

A1

ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПРОТИВ CD79, КЛЕТКИ CAR-T И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

5

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и настоящим включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 9 ноября 2020 года, называется «JBI6171WOPCT1_SL.txt» и имеет размер 488479 байт.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к нацеленным на CD79b химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим одноцепочечные вариабельные нацеленные на CD79b фрагменты, и сконструированным нацеленным на CD79b иммунным клеткам, экспрессирующим CAR. Также предложены нуклеиновые кислоты и экспрессионные векторы, кодирующие CAR, рекомбинантные клетки, содержащие векторы, и композиции, содержащие сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие CAR, нацеленные на CD79b. Также предложены способы получения CAR и сконструированных иммунных клеток и способы применения сконструированных иммунных клеток для лечения патологических состояний, включая рак.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В терапии Т-клетками используются выделенные Т-клетки, которые были генетически модифицированы для усиления их специфичности к специфическому опухолеассоциированному антигену. Генетическая модификация может включать экспрессию химерного антигенного рецептора (CAR) или экзогенного Т-клеточного рецептора для обеспечения новой антигенной специфичности Т-клетки. Т-клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы (CAR-Т-клетки), могут индуцировать иммунореактивность опухоли. Существует потребность в лучших видах противоопухолевой терапии с использованием CAR-Т-клеток.

Неходжкинская лимфома (NHL) составляет около 4% всех видов рака. Несмотря на улучшение доступных видов терапии, рецидивирующая/рефрактерная

(г/г) NHL характеризуется равномерно плохим прогнозом. Адоптивная иммунотерапия с использованием Т-клеток, генетически сконструированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), демонстрирует многообещающие результаты лечения CD19-положительных В-клеточных злокачественных новообразований, однако даже при начальной общей частоте ответа приблизительно 60–80% только 40% пациентов достигают долгосрочной полной ремиссии [1,2]. В настоящее время появляются клинические данные о рецидиве заболевания вследствие потери антигена CD19 как при остром лимфобластном лейкозе (ALL), так и у пациентов с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (DLBCL), что указывает на неудовлетворенную клиническую потребность в средствах, нацеленных на новые поверхностные антигены [2,4].

В-клетки (В-лимфоциты) представляют собой центральные компоненты адаптивного иммунитета, реагирующие на несколько различных патогенов посредством выработки антител, выполнения роли антигенпрезентирующих клеток, секретирования цитокинов и превращения в В-клетки памяти после активации [5]. В-клетки циркулируют в крови и лимфатической системе. В лимфоидных органах они сталкиваются со своим когнатным антигеном и в сочетании с дополнительным сигналом от Т-хелперной клетки могут дифференцироваться в эффекторные плазматические клетки. Данные клетки секретируют специфические антитела, которые циркулируют в крови, для нацеливания и устранения антигенов или патогенов [6].

Для обнаружения антигена или патогена В-клетки имеют В-клеточные рецепторы (BCR) на клеточной поверхности, которая представляет собой многокомпонентный рецептор, состоящий из трансмембранной молекулы иммуноглобулина (mIg) и дисульфидного связывающего гетеродимера CD79a (Igα) и CD79b (Igβ). CD79b в значительной степени экспрессируется в широком диапазоне В-клеточных лимфом. Было показано, что его экспрессия имеет решающее значение для жизнеспособности раковых клеток большинства моделей опухолей DLBCL. Таким образом, развитие резистентности к нацеленным на Cd79b агентам посредством потери антигена может быть менее вероятным, что делает его привлекательной мишенью для разработки новых иммунотерапевтических подходов. В клинической практике недавно был одобрен полатузумаб (Polivy™), молекула конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), нацеленная на CD79b, для лечения г/г DLBCL [7]. Лечение полатузумабом обеспечивает увеличение полного ответа (CR) и длительности ответа

(DOR) при сочетании со стандартным лечением (бендамустином и ритуксимабом), что подтверждает CD79b в качестве хорошей терапевтической мишени [8].

Соответственно, существует потребность в разработке нацеленной на CD79b терапии на основе CAR-T.

5

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описаны химерные антигенные рецепторы (CAR), например, CAR, которые нацелены на кластер белка дифференциации 79B (CD79b), клетки, содержащие VAR, векторы, кодирующие CAR, например, рекомбинантные векторы экспрессии, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR, способы получения CAR, композиции, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева, популяции клеток и способы лечения расстройств, например рака, с использованием описанных CAR.

В одном аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

- (a) внеклеточный домен, содержащий scFv, который специфически связывается с антигеном кластера белка дифференциации 79B (CD79b);
- (b) трансмембранный домен; и
- (c) внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит

- (d) шарнирную область CD8a,

где трансмембранный домен включает полипептид CD8a трансмембранной области (CD8a-TM); и

где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен, содержащий компонент члена 9 суперсемейства TNF-рецепторов (CD137) и первичный сигнальный домен, содержащий компонент дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Cd8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 38;

трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 39; и/или

внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 40, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 41.

В другом аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 224;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 238, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 242, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 243, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 244;

5 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250;

10 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 253, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 255;

15 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259;

20 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 243, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 269, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 270; или

25 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 275, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 276;

где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

30 В другом аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

NO: 246, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 247;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 251, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 252;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 251, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 267;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 271, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 272, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273; или

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 277, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278;

где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен дополнительно содержит:

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213;

NO: 236, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 252;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 251, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 267;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 271, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 272, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273; или

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 277, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278. В другом аспекте в настоящем изобретении предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный

антигенсвязывающий домен содержит: CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

208, 216, 222, 228, 232, 238, 242, 248, 253, 257, 263, 268 или 274, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 209, 217, 223, 233, 239,

243, 249, 254, 258, 269 или 275, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 210, 218, 224, 229, 234, 240, 244, 250, 255, 259, 264,

270 или 276, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 211, 214, 215, 219, 225, 230, 235, 241, 245, 251, 260, 265, 271 или 277, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 212, 220,

226, 231, 236, 246, 261, 266 или 272 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 221, 226, 231, 236, 246, 261, 266 или 272 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотные

последовательности с SEQ ID NO: 213, 221, 227, 237, 247, 252, 256, 262, 267, 273 или 278.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность

- a) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211, 212 и 213, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 214, 212 и 213, соответственно;
- c) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 215, 212 и 213, соответственно;
- d) SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220 и 221, соответственно;
- e) SEQ ID NO: 222, 223, 224, 225, 226 и 227, соответственно;
- f) SEQ ID NO: 228, 217, 229, 230, 231 и 221, соответственно;
- g) SEQ ID NO: 232, 233, 234, 235, 236 и 237, соответственно;
- h) SEQ ID NO: 238, 239, 240, 241, 226 и 227, соответственно;
- i) SEQ ID NO: 242, 243, 244, 245, 246 и 247, соответственно;
- j) SEQ ID NO: 248, 249, 250, 251, 236 и 252, соответственно;
- k) SEQ ID NO: 253, 254, 255, 251, 236 и 256, соответственно;
- l) SEQ ID NO: 257, 258, 259, 260, 261 и 262, соответственно;
- m) SEQ ID NO: 263, 243, 264, 265, 266 и 267, соответственно;
- n) SEQ ID NO: 268, 269, 270, 271, 272 и 273, соответственно; или
- o) SEQ ID NO: 274, 275, 276, 277, 266 и 278, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 19;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 20;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 2, и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 29;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 31;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 33;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 16, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 35;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 17, и

5 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 33; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 18, и

10 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую
15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую
30 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; или

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерный полипептид между вариабельной областью легкой цепи (VL) и вариабельной областью тяжелой цепи (VH). В некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 42. В

30 некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75-118. В некоторых вариантах осуществления scFv

содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75-118. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит сигнальный полипептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента члена суперсемейства дифференцировки и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 163. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В различных вариантах осуществления CAR дополнительно содержит шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8a. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Cd8a содержит аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-162. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-162.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164-207. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164-207.

В другом аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259.

В другом аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен может содержать CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, 258, 259, 260, 261, и 262, соответственно.

В другом аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и
 5 внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 14, и
 10 вариабельную область легкой цепи (VL), имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 32, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

В другом аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и
 15 внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи (VL),
 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

В различных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), scFv содержит
 20 вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL). scFv также может содержать линкерный полипептид между вариабельной областью тяжелой цепи (VH) и вариабельной областью легкой цепи (VL). В определенных
 25 вариантах осуществления линкерный полипептид может содержать аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 42. В определенных вариантах осуществления линкерный полипептид может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В определенных вариантах осуществления scFv может содержать
 30 аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 113. В определенных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен может содержать сигнальный полипептид. В таких вариантах осуществления

сигнальный полипептид может содержать аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 37. В таких вариантах осуществления линкерный полипептид может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

5 В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента члена суперсемейства дифференцировки и их
10 комбинации. В качестве неограничивающего примера компонент CD137 может содержать аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 40; компонент CD3z может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 41; и внутриклеточный сигнальный домен может содержать аминокислотную
15 последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 163. В другом неограничивающем примере компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; компонент CD3z может содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 41; и внутриклеточный сигнальный домен может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:
20 163.

В определенных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 163. В определенных вариантах осуществления
25 внутриклеточный сигнальный домен может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может содержать полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM). В таких вариантах осуществления полипептид CD8a-TM может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 39. В
30 таких вариантах осуществления полипептид CD8a-TM может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления CAR, раскрытые в настоящем документе, могут дополнительно содержать шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых

вариантах осуществления шарнирная область может представлять собой шарнирную область CD8a. В таких вариантах осуществления шарнирная область Cd8a может содержать аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 38. В таких вариантах осуществления шарнирная область CD8a может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 157. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

В определенных вариантах осуществления раскрытые в данном документе CAR могут содержать аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 202. В некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном документе CAR могут содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202. В другом аспекте предложен выделенный лимфоцит, экспрессирующий любой из описанных выше CAR. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой натуральную клетку-киллер (NK).

Также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая любой из описанных выше CAR. Также предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты. Кроме того, предложена клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты.

Дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество любого из указанных выше лимфоцитов, а также фармацевтически приемлемый эксципиент.

В другом аспекте предложен способ лечения субъекта, имеющего рак. Способ включает введение терапевтически эффективного количества указанных выше лимфоцитов или указанной выше фармацевтической композиции нуждающемуся в этом субъекту, посредством чего лимфоциты индуцируют уничтожение раковых клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), мантийноклеточную лимфому (MCL), фолликулярную лимфому (FL), лимфому

маргинальной зоны (MZ), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), множественную миелому (MM), лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, волосатоклеточный лейкоз или плазмоцитому.

5 В другом аспекте предложен способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий приведение раковой клетки в контакт с любым из указанных выше лимфоцитов, посредством чего лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой злокачественную В-клетку. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка
10 представляет собой клетку неходжкинской лимфомы. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой клетку диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (DLBCL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), фолликулярной лимфомы (FL), лимфомы маргинальной зоны (MZ), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL),
15 множественной миеломы (MM), лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфомы Ходжкина, лимфомы Беркитта, волосатоклеточного лейкоза или плазмоцитомы.

В другом аспекте предложен способ обнаружения наличия рака у субъекта, включающий:

- 20 (a) приведение образца клеток, полученного от субъекта, в контакт с любым из указанных выше CAR, тем самым формируя комплекс CAR-клетка, и
(b) обнаружение комплекса, причем обнаружение комплекса указывает на наличие рака у субъекта.

25 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Вышеизложенное станет очевидным из представленного ниже более подробного описания примера вариантов осуществления изобретения, которые проиллюстрированы на прилагаемых графических материалах.

30 Данный файл заявки на патент содержит по меньшей мере один цветной рисунок. Копии данной заявки на патент с цветным (-и) рисунком (-ами) будут предоставлены патентным офисом после подачи соответствующей заявки и внесения оплаты.

На **фиг. 1** представлена диаграмма иллюстративной молекулярной структуры CAR aCD79b. scFv aCD79b были клонированы в последовательности с

шарнирным/трансмембранным доменом CD8a, внутриклеточным доменом CD137 и внутриклеточным доменом CD3zeta.

На **фиг. 2А-2І** показано образование первичных клеток CAR-T человека, экспрессирующих CAR aCD79b. Первичные Т-клетки человека выделяли посредством отрицательного отбора и стимулировали либо с использованием Transcact (Miltenyi) в среде TechMACS (**фиг. 2А-2С, фиг. 2G-2І**), или с использованием гранул с антителами к Cd3/CD28 (Dynabeads, invitrogen) в среде Optimizer (**фиг. 2D-2F**). В обоих случаях среду дополняли 100 ед./мл IL-2 (Miltenyi). Клетки трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими конструкцию CAR, через 24 часа после стимуляции и культивировали в течение 12–14 дней. Среду и цитокины обновляли каждые 2–4 дня. Экспрессию CAR CD79b количественно определяли посредством проточной цитометрии с использованием рекомбинантного внеклеточного домена CD79b человека, слитого с белком AF647. Показана частота клеток CAR+. На **фиг. 2А-АС и 2Е** все конструкции SN8 (CD9W) находятся в ориентации LH.

На **фиг. 3А-3F** продемонстрировано, что CAR aCD79b проявляют цитотоксичность против линий опухолевых клеток CD79b+. CAR aCD79b совместно культивируют с указанными линиями клеток-мишеней и с указанным соотношением эффектор:мишень (Е:Т) (на основе частоты CAR+) в течение 16–20 часов. Лизис опухоли оценивали посредством проточной цитометрии после окрашивания красителем LIVE/DEAD (**фиг. 3А**) или путем потери сигнала люциферазы опухолевых клеток (**фиг. 3В-3F**) с использованием набора Promega BrightGlo согласно инструкциям производителя. В каждом случае % лизиса рассчитывали в сравнении с состоянием опухоли отдельно. Наблюдали дозозависимую противоопухолевую активность CAR клеток-мишеней CD79b+, при этом лизис не превышал фоновые значения против мишеней CD79b^{neg}. На **фиг. 3А-3D** все конструкции SN8 (CD9W) находятся в ориентации LH. На **фиг. 3Е-3F** ориентация HL или LH указана первой буквой.

На **фиг. 4А-4D** представлены CAR aCD79b, секретирующие цитокин в ответ на стимуляцию антигенположительными опухолевыми клетками. Супернатанты из совместных культур, как описано на **фиг. 3**, собирали через 16–20 часов после постановки, и цитокин определяли количественно с использованием набора MSD (Meso Scale Diagnostics) в соответствии с протоколом производителя. CAR aCD79b демонстрировали антигензависимую выработку цитокинов. На **фиг. 4А-4С** все

конструкции SN8 (CD9W) находятся в ориентации LH. На **фиг. 4D** ориентация HL или LH указана первой буквой.

На **фиг. 5A-5C** показано, что CAR aCD79b специфически пролиферируют в присутствии антигена. CAR aCD79b метили CellTraceViolet (CTV) в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen). Меченые клетки CAR-T совместно культивировали с указанными мишенями при соотношении E:T 1:2 в течение 4–5 дней, а затем окрашивали реагентом для обнаружения CAR (рекомбинантный CD79b-AF647). Затем проводили анализ пролиферации клеток CAR посредством проточной цитометрии. Графики показывают разведение CTV клеток CAR+. CAR aCD79b продемонстрировали разведение CTV (пролиферацию), специфически при стимуляции линий опухолей CD79b+, но не против отрицательных в отношении антигена целевых линий. На **фиг. 5A-5C** все конструкции SN8 (CD9W) находятся в ориентации LH. На **фиг. 5C** ориентация HL или LH указана первой буквой.

На **фиг. 6** показано, что CAR aCD79b проявляют цитотоксичность против линий опухолевых клеток CD79b+. CAR aCD79b культивировали совместно в течение 4–7 дней с указанными экспрессирующим RFP линиями клеток-мишеней и с указанным соотношением эффектор:мишень (E:T) (на основе частоты CAR+). За пролиферацией клеток с течением времени наблюдали посредством визуализации каждой лунки каждые 4 часа и вычисляли общую площадь RFP+/лунку с использованием технологии IncuCyte®. Ингибирование роста рассчитывали для каждой из испытанных конструкций. На **фиг. 6** все конструкции SN8 (CD9W) находятся в ориентации LH.

На **фиг. 7A-7C** показано, что клетки CAR-T aCD79b уничтожают опухоли CD79b+ *in vivo*. Клетки CARNAVAL 5×10^5 имплантировали подкожно мышам NOD/scid/IL-2Rg^{-/-} (NSG). Когда средний объем опухоли в группе достигал около 50–100 мм³/мышь, клетки CAR-T инъецировали внутривенно (**фиг. 7A**). Опухоли (**фиг. 7B**) и массу тела (**фиг. 7C**) отслеживали два раза в неделю.

На **фиг. 8A-8C** показано, что базальные уровни цитокинов в трандуцированных aCD79b CAR-T-клетках не повышены в отсутствие антигена или стимуляции цитокинами. Образованные ранее aCD79b CAR-T-клетки высевали в трех повторностях в количестве 50000 клеток CAR+ на лунку. Общее количество Т-клеток на лунку нормализовали по условиям посредством добавления нетрансдуцированных (UTD) клеток. Супернатанты культуры собирали после культивирования в течение ночи и количественно определяли уровни цитокинов с использованием MSD (набор V

Plex Proinflammation Panel 1 [для человека]). Уровни $\text{INF}\gamma$, IL-2 и $\text{TNF}\alpha$, обнаруженные в супернатантах клеток CAR-T 441-HL, CAR-T cD19 и UTD, наносили на график как среднее (пг на мл) $\pm$ стандартная ошибка среднего для каждого донора.

На **фиг. 9А-9В** представлено отсутствие аберрантной базальной пролиферации или активации клетками CAR-T 441-HL в отсутствие антигена или стимуляции цитокинов. Пятидневный анализ пролиферации проводили в клетках CAR-T 441-HL для скрининга аберрантной базальной пролиферации или активации. После мечения красителем Cell Trace™ Violet (CTV) (5 мМ) клетки CAR-T разводили до концентрации 5×10^5 жизнеспособных клеток CAR⁺-T. Затем клетки (100 мкл) вносили в 96-луночный круглодонный планшет, где их выращивали в отсутствие клеток-мишеней или стимуляции цитокинов в течение пяти дней. Целевые положительные клетки (CARNAVAL) и целевые отрицательные клетки (K562) аналогичным образом высевали с получением CAR⁺ в соотношении эффектор:мишень (E:T) 1:1 и культивировали в тех же условиях. На 5 день клетки анализировали посредством гейтинга проточной цитометрии на CD3, а затем CAR. Разведение красителя CTV (канал Pacific Blue) и маркер экспрессии CD71 применяли для определения процента пролиферирующих (**фиг. 9А**) и активированных (**фиг. 9В**) клеток CAR-T, соответственно, от пяти доноров.

На **фиг. 10А-10R** продемонстрировано антиген-специфичное уничтожение раковых клеток посредством клеток CAR-T 441-HL в присутствии клеток CD79b/CD19⁺ у всех испытанных доноров. Проточную цитометрию применяли для проверки влияния клеток CAR-T 441-HL на панели из пяти клеточных линий CD79b/CD19⁺ (HBL-1, OCI-LY-10, CARNAVAL, WILL-2 и JEKO-1) и пяти клеточных линий CD79b/CD19⁻ (K562, HLY-1, SU-DHL-1, HL-60 и JURKAT E6.1). K562, сконструированные для экспрессии CD79b, были включены в качестве дополнительного контроля. После оттаивания и покоя в течение ночи подсчитывали клетки и процент клеток CAR⁺, нормализованных для каждого донора посредством добавления нетрансдуцированных клеток. Затем нормализованные клетки CAR-T подсчитывали и повторно суспендировали в концентрации 5×10^5 клеток CAR⁺ на мл для начального отношения E:T CAR⁺ 2,5:1. Всего готовили восемь 2-кратных разведений, и эффекторные клетки высевали в 96-луночный планшет (100 мкл на лунку). Линии клеток-мишеней собирали, подсчитывали и повторно суспендировали в концентрации 4 миллионов клеток на мл. Затем их метили посредством Cell Trace™ Violet (CTV), разбавляли до 2×10^5 жизнеспособных клеток на мл, и 100 мкл меченных

клеток добавляли в 96-луночные планшеты, содержащие клетки CAR-T. После 24-часового инкубационного периода клетки окрашивали с использованием фиксирующего красителя для определения жизнеспособности клеток eFluor™ 660. Опухолевые клетки оценивали посредством проточной цитометрии путем гейтинга с использованием прямого рассеяния и бокового рассеяния для идентификации популяций клеток; затем с окрашиванием красителем LIVE/DEAD для идентификации жизнеспособных клеток; и, наконец, на событиях опухолей CTV+ для оценки количества жизнеспособных раковых клеток в каждой лунке. Процент (%) уничтожения раковых клеток рассчитывали как абсолютное количество жизнеспособных раковых клеток при каждом отношении Е:Т, разделенном на среднее абсолютное количество жизнеспособных раковых клеток в лунках с отношением Е:Т 0:1, а затем умноженное на 100. Данные наносили на график как среднее +/- стандартная ошибка среднего (3 отдельных экспериментов). Объединенные графики для пяти доноров показаны на **фиг. 10А-10С**, а также на **фиг. 10D-10F** для клеток CD79b/CD19+ и CD79b/CD19-, соответственно. Графики, показывающие отдельную кривую уничтожения для каждого из пяти доноров, показаны на **фиг. 10G-10L**, а также на **фиг. 10M-10R**, для клеток CD79b/CD19+ и CD79b/CD19-, соответственно.

На **фиг. 11А-11F** показано конкретное уничтожение антигенположительных клеточных линий посредством клеток CAR-T 441-HL с использованием технологии IncuCyte®. Используя преимущества технологии IncuCyte®, кинетику уничтожения CAR-T 441-HL оценивали на панели из двух клеточных линий CD79b/CD19+ (HBL-1, OCI-LY-10) и двух клеточных линий CD79b/CD19-, экспрессирующих mKATE2 (HLY-1, SU-DHL-1). После оттаивания и покоя в течение ночи подсчитывали клетки и процент клеток CAR+, нормализованных для каждого донора посредством добавления нетрансдуцированных клеток. Затем нормализованные клетки CAR-T подсчитывали и повторно суспендировали в концентрации 5×10^5 клеток CAR+ на мл для начального отношения Е:Т CAR+ 2,5:1. Всего готовили восемь 2-кратных разведений, и эффекторные клетки высевали в 96-луночный планшет (100 мкл на лунку). Целевые клеточные линии собирали, подсчитывали, повторно суспендировали в концентрации 1×10^5 клеток на мл и высевали в соответствии со схемой планшета (96-луночный планшет; 100 мкл на лунку). После смешивания клеток CAR-T и клеток-мишеней 80 мкл из каждой лунки переносили в двух повторностях в 384-луночный планшет. Затем совместные культуры помещали в систему визуализации в реальном времени IncuCyte® ZOOM, а изображения автоматически получали как в фазе, так и в

флуоресцентных каналах каждые 4 часа в течение 4–6 дней с использованием объектива с 4-кратным увеличением (одно изображение). Уровень клеток-мишеней количественно определяли на основе экспрессии красного флуоресцентного белка mKATE2. Для количественного определения уничтожения раковых клеток с течением времени средняя площадь каждой репликации была экспортирована в GraphPad Prism и для каждого условия получены значения площади под кривой (AUC). После нормализации до необработанного контроля отношения Е:Т наносили на график по значениям AUC в качестве дозозависимого ответа. Были созданы графики доза-ответ как для объединенных (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего), так и для отдельных значений для пяти доноров (два независимых эксперимента). Объединенные графики показаны на **фиг. 11А** и **фиг. 11В**, для клеток CD79b/CD19⁺ и CD79b/CD19[–], соответственно. Графики, показывающие отдельную кривую уничтожения для каждого донора, показаны на **фиг. 11С-11D** и **фиг. 11Е-11F** для клеток CD79b/CD19⁺ и CD79b/CD19[–], соответственно.

На **фиг. 12А-12J** показан пример антигенспецифического продуцирования провоспалительных цитокинов клетками CAR-T 441-HL. Супернатанты из четырех клеточных линий CD79b/CD19⁺ (HBL-1, OCI-LY-10, CARNAVAL, WILL-2) и двух клеточных линий CD79b/CD19[–] (HLY-1 и SU-D-1) собирали во время анализа на основе проточной цитометрии и исследовали с использованием Meso Scale Discovery (MSD). Проводили анализ данных, и результаты для каждого цитокина наносили на график в виде отдельных значений для каждого из пяти доноров (два независимых эксперимента), а также среднее значение для каждой группы лечения. Графики уровней INF γ , IL-2, TNF α , IL-6 (пг на мл), обнаруженных в супернатантах клеток CAR-T 441-HL, CAR-T CD19 и UTD, собранных для каждого донора, а также объединенные для каждого донора (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего) показаны на **фиг. 12А-12D**. Графики уровней IL-4, IL-1 β , IL10 и IL12p70 (пг на мл), обнаруженных в супернатантах клеток CAR-T 441-HL, CAR-T CD19 и UTD, собранных для каждого донора, а также объединенные для всех доноров (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего) показаны на **фиг. 12Е-12H**. Графики уровней IL-13 и IL-8 (пг на мл), обнаруженных в супернатантах клеток CAR-T 441-HL, CAR-T CD19 и UTD, собранных для каждого донора, а также объединенные для всех доноров (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего), показаны на **фиг. 12I-12J**.

На **фиг. 13А-13С** показано дозозависимое ингибирование роста опухоли клетками CAR-T CD79b в модели ксенотрансплантата CARNAVAL. На **фиг. 13А**

представлено схематическое изображение экспериментальной модели, используемой для исследования эффективности клеток CAR-T CD79b *in vivo* в модели ксенотрансплантата CARNAVAL. Клетки CARNAVAL (5×10^5) в логарифмической фазе роста имплантировали подкожно мышам NOD/scid/IL-2Rg^{-/-} (NSG) в день 0.

5 Когда средний объем опухоли группы достигал приблизительно 50–100 мм³/мышь (14 дней после имплантации), дозы клеток CAR⁺-T, описанные в данном документе, вводили внутривенно. Регистрировали объем опухоли и массу тела, и образцы крови собирали через равные промежутки времени. Средний объем опухоли (масса 2 мм ± стандартная ошибка среднего) через сутки после имплантации опухоли показан на **фиг. 13В**. Среднее процентное изменение массы тела (% ± стандартная ошибка среднего) в дни после имплантации опухоли показано на **фиг. 13С**.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Описание иллюстративных вариантов осуществления данного изобретения приведено ниже.

15 Настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), нацеленным на кластер дифференциации белка 79В (CD79b), клеткам, содержащим такие CAR, и способам лечения рака (например, В-клеточной лимфомы) с использованием CAR, описанных в настоящем документе.

20 CAR по настоящему изобретению имеют антигенную специфичность в отношении CD79b. В контексте настоящего документе фразы «имеет антигенную специфичность» и «вызывают антигенспецифический ответ» означает, что CAR может специфически связываться с антигеном и иммунологически распознавать его, так что связывание CAR с антигеном CD79b вызывает иммунный ответ. Способы тестирования CAR на антигенную специфичность и на способность распознавать 25 клетки-мишени известны в данной области техники.

В изобретении также предложены родственные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, популяции клеток, антитела или их антигенсвязывающие участки, и фармацевтические композиции, относящиеся к CAR согласно изобретению.

30 Ниже описаны несколько аспектов данного изобретения со ссылкой на примеры и лишь в иллюстративных целях. Следует понимать, что изложены многочисленные конкретные детали, взаимосвязи и способы, чтобы обеспечить полное понимание данного изобретения. Тем не менее, рядовому специалисту в соответствующей области техники будет понятно, что данное изобретение можно реализовать на практике без

одной или большего числа конкретных деталей, или применять на практике другие способы, протоколы, реагенты, линии клеток и животных. Данное изобретение не ограничено проиллюстрированным порядком действий или событий, так как некоторые действия могут происходить в другом порядке и (или) одновременно с другими действиями или событиями. Более того, не все проиллюстрированные действия, этапы или события необходимы для реализации методологии в соответствии с данным изобретением. Многие из методик и процедур, описанных или упоминаемых в данном документе, хорошо понятны и широко применяются с использованием традиционной методологии специалистами в данной области техники.

Если не указано иное, все термины из данной области техники, обозначения и другие научные термины или терминология, употребляемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном документе для ясности и (или) для удобства ссылки, и включение таких определений в данный документ не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимается в данной области техники. Кроме того, следует понимать, что термины, такие как термины, определенные в широко используемых словарях, следует интерпретировать как имеющие значение, соответствующее их значению в контексте соответствующей области техники и (или) как определено в данном документе иным образом.

Определения

В случае представления списка, если не указано иное, следует понимать, что каждый отдельный элемент этого списка и каждая комбинация из этого списка является отдельным вариантом осуществления. Например, список вариантов осуществления, представленный в виде «А, В или С», следует интерпретировать как список, включающий варианты осуществления «А», «В», «С», «А или В», «А или С», «В или С» или «А, В или С».

Применяемые в данном документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления данного изобретения и не предназначены быть ограничивающими. При использовании в данном документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Переходные термины «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из» предназначены для обозначения их по существу общепринятых патентных значений; т. е. (i) термин «содержащий», который является синонимом терминам «включающий», «содержащий» или «характеризующийся», является включающим или неограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или стадии способа; (ii) «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в формуле изобретения; и (iii) «состоящий по существу из» ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или стадиями «и тем, что не оказывает существенного влияния на основную (-ые) и новую (-ые) характеристику (-и)» заявленного изобретения. Варианты осуществления, описанные в отношении фразы «содержащий» (или его эквивалентов), обеспечивают такое же значение, как варианты осуществления, описанные независимо друг от друга в отношении фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из».

Термин «около» или «приблизительно» включает в себя статистически значимый диапазон значений. Такой диапазон может находиться в пределах порядка величины, предпочтительно – в пределах 50%, более предпочтительно – в пределах 20%, еще более предпочтительно – в пределах 10% и еще более предпочтительно – в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Допустимое изменение, охватываемое термином «около» или «приблизительно», зависит от конкретной изучаемой системы и может быть легко оценено рядовым специалистом в данной области техники.

«Активация» или «стимуляция» означает индукцию изменения биологического состояния клеток, посредством которого клетки (например, Т-клетки и НК-клетки) экспрессируют маркеры активации, продуцируют цитокины, пролиферируют и/или становятся цитотоксическими по отношению к клеткам-мишеням. Все эти изменения могут быть вызваны первичными стимулирующими сигналами. Костимулирующие сигналы могут усиливать величину первичных сигналов и подавлять гибель клеток после начальной стимуляции, что приводит к более продолжительному состоянию активации и, таким образом, более высокой цитотоксической способности. Термин «костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации и/или активации Т-клеток и/или НК-клеток и/или повышению или понижению экспрессии ключевых молекул.

Термин «биспецифический» относится к молекуле (такой как антитело), которая специфически связывается с двумя разными антигенами или двумя разными эпитопами в пределах одного антигена. Биспецифическая молекула может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca cynomolgus* (яванский макак, крабодед) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин «химерный антигенный рецептор» (CAR), используемый в настоящем документе, определяется как клеточный рецептор, содержащий внеклеточный мишень-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, образующие комбинацию, которая в природе не встречается на одном белке. В частности, сюда относятся рецепторы, в которых внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен в природе не встречаются на белке одного рецептора. Химерные антигенные рецепторы настоящего изобретения предназначены главным образом для применения с лимфоцитами, такими как Т-клетки и естественные киллеры (NK).

Термин «кодирующий» относится к свойству, присущему конкретным последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК), или определенную последовательность аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК, так и не кодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут называться кодирующими белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность», включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК», может также включать

интроны в той мере, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых версиях содержать интрон (-ы).

Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий регулирующие экспрессию последовательности, функционально соединенные с экспрессируемой нуклеотидной последовательностью. Вектор экспрессии содержит достаточное количество cis-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут обеспечиваться клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

Термин «гетерологичный» относится к двум или более полинуклеотидам или двум или более полипептидам, не находящимся в одинаковых отношениях друг к другу в природе.

Термин «гетерологичный полинуклеотид» относится к не встречающемуся в природе полинуклеотиду, который кодирует два или более неоантигенов, как описано в настоящем документе.

Термин «гетерологичный полипептид» относится к не встречающемуся в природе полипептиду, содержащему два или более неоантигенных полипептида, как описано в настоящем документе.

Термин «клетка-хозяин» обозначает любую клетку, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. Типичная гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой вектор (например, вектор экспрессии).

Термины «Т-клетка» и «Т-лимфоцит» являются взаимозаменяемыми и используются в настоящем документе как синонимы. В настоящем документе Т-клетка включает тимоциты, наивные Т-лимфоциты, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, покоящиеся Т-лимфоциты или активированные Т-лимфоциты. Т-клетка может представлять собой клетку Т-хелпер (Th), например Т-хелпер 1 (Th1) или Т-хелпер 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; CD4+ Т-клетка) CD4+ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; CD8+ Т-клетка), инфильтрирующую опухоль цитотоксическую Т-клетку (TIL; CD8+ Т-клетка), CD4+CD8+ Т-клетку или любую другую подгруппу Т-клеток. Другие иллюстративные популяции Т-клеток, подходящих для применения в конкретных вариантах

осуществления, включают наивные Т-клетки и Т-клетки памяти. Также включены «NKT-клетки», относящиеся к специализированной популяции Т-клеток, которые экспрессируют полуинвариантный $\alpha\beta$ Т-клеточный рецептор, но также экспрессируют различные молекулярные маркеры, которые, как правило, ассоциированы с Nk-клетками, такими как NK1.1. NKT-клетки включают NK1.1+ и NK1.1-, а также CD4+, CD4-, CD8+ и CD8- клетки. TCR на NKT-клетках уникален тем, что он распознает гликолипидные антигены, презентированные подобной ГКГС I молекулой CD Id. NKT-клетки могут иметь как защитные, так и вредные эффекты из-за их способности продуцировать цитокины, которые способствуют воспалению или иммунной толерантности. Также включены «гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки)», которые относятся к специализированной популяции, то есть к небольшой субпопуляции Т-клеток, обладающих отличным TCR на своей поверхности, и в отличие от большинства Т-клеток, в которых TCR состоит из двух гликопротеиновых цепей, обозначенных как цепи α - и β -TCR, TCR в $\gamma\delta$ Т-клетках состоит из γ -цепи и δ -цепи. $\gamma\delta$ Т-клетки могут играть роль в иммунном надзоре и иммунорегуляции, и было обнаружено, что они являются важным источником IL-17 и индуцируют устойчивый CD8+ цитотоксический Т-клеточный ответ. Также включены «регуляторные Т-клетки» или «Трег», которые относятся к Т-клеткам, которые подавляют аномальный или избыточный иммунный ответ и играют роль в иммунной толерантности. Регуляторные Т-клетки, как правило, представляют собой позитивные по фактору транскрипции Foxp3 CD4+ Т-клетки, а также могут включать негативные по фактору транскрипции Foxp3 регуляторные Т-клетки, которые являются продуцирующими IL-10 CD4+ Т-клетками.

Термины «клетка-натуральный киллер» и «NK-клетка» являются взаимозаменяемыми и используются в данном документе как синонимы. В настоящем документе термин «NK-клетка» относится к дифференцированному лимфоциту с фенотипом CD 16+ CD56+ и/или CD57+ TCR-. NK-клетки характеризуются способностью связываться с клетками, которые не экспрессируют «собственные» антигены MHC/HLA, и уничтожать их путем активации специфических цитолитических ферментов, способностью уничтожать опухолевые клетки или другие пораженные клетки, которые экспрессируют лиганд для рецепторов, активирующих NK-клетки, а также способностью высвобождать молекулы белка, называемые цитокинами, которые стимулируют или ингибируют иммунный ответ.

В настоящем документе термин «антиген» относится к любой молекуле агента (например, белку, пептиду, полисахариду, гликопротеину, гликолипиду, нуклеиновой кислоте, их частям или их комбинациям), способной связываться с Т-клеточным рецептором. Антиген также способен вызывать иммунный ответ. Пример такого иммунного ответа может предполагать, без ограничений, или выработку антител, или активацию специфичных иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген вообще не должен кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть сгенерирован путем синтеза, может быть получен из биологического образца или может представлять собой макромолекулу, помимо полипептида. Такой биологический образец может представлять собой, в том числе, образец ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами, организмами, субъединицами белков/антигенов, убитых или инактивированных цельных клеток или лизатов.

«Антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающий домен» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие домены могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают части иммуноглобулина, которые связывают антиген, такие как VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, переменные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, VHH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, альтернативные каркасы, которые связывают антиген, и мультиспецифические белки, содержащие антигенсвязывающие фрагменты. Антигенсвязывающие фрагменты (такие как VH и VL) могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одиночных антител, в которых домены VH/VL можно объединять в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными цепями с образованием моновалентного антигенсвязывающего домена, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело. Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть конъюгированы с другими антителами, белками, антигенсвязывающими фрагментами или альтернативными

каркасом, которые могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими для конструирования биспецифических и мультиспецифических белков.

Термины «антитело» и «антитела» относятся к моноклональным антителам, мультиспецифическим антителам, человеческим антителам, гуманизированным антителам, химерным антителам, одноцепочечным Fv (scFv), одноцепочечным антителам, Fab-фрагментам, F(ab')-фрагментам, дисульфид-связанным Fv (sdFv), интрателам, минителам, диателам и антиидиотипическим (анти-Id) антителам (включая, например, анти-Id антитела к антиген-специфическим TCR), а также эпитоп-связывающим фрагментам любого из вышеперечисленных. Термины «антитело» и «антитела» также относятся к ковалентным диателам, таким как описанные в заявке на патент США № 2007/0004909, и Ig-Dars, таким как описанные в заявке на патент США № 2009/0060910. Антитела, пригодные в качестве TCR-связывающей молекулы, включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулина, т. е. молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт. Молекулы иммуноглобулина могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1, IgM2, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Термин «человеческое антитело» относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Вариабельные области человеческого антитела получают из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Если антитело содержит константную область или часть константной области, константную область также получают из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области человеческого антитела получены из системы, в которой используют иммуноглобулин человеческой зародышевой линии или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные отличные от человека животные, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения человеческих антител и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций, намеренного введения замен в

каркасные участки и/или CDR, или и то и другое. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности на по меньшей мере около 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина человеческой зародышевой линии или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57–86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385–96 и международной публ. пат. № WO2009/085462. Антитела, в которых по меньшей мере одна CDR получена из отличного от человека вида, не включены в определение «человеческого антитела».

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Термины «специфически связывается», «специфическое связывание», «специфически связывает» или «связывает» относятся к связыванию белковой молекулы с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем у других антигенов. Как правило, белковая молекула связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации (K_D) около 1×10^{-7} М или менее, например около 5×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее или около 1×10^{-12} М или менее, как правило, со значением K_D , которое по меньшей мере в сто раз ниже его значения K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). В контексте антигена CD79b, описанного в настоящем документе, термин «специфическое связывание» относится к связыванию белковой молекулы с антигеном CD79b без обнаруживаемого связывания с белком дикого типа, вариантом которого является неоантиген.

Термин «клетка-хозяин» обозначает любую клетку, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. Гетерологичная нуклеиновая кислота может представлять собой вектор (например, вектор экспрессии). Например, клеткой-хозяином может быть клетка любого организма, которая отбирается, модифицируется, трансформируется, выращивается, используется или проходит любые манипуляции для продуцирования клеткой вещества, например экспрессии клеткой гена, последовательности ДНК или РНК, белка или фермента. Может определяться подходящая клетка-хозяин. Например, клетка-хозяин может быть выбрана на основании каркаса вектора и желаемого результата. В качестве примера в прокариотическую клетку можно вводить плазмиду или космиду для репликации нескольких типов векторов. В качестве клеток-хозяев для репликации и/или экспрессии вектора можно использовать бактериальные клетки, такие как, без ограничений, DH5 α , JM109 и KCB, SURE® Competent Cells и SOLOPACK Gold Cells. Кроме того, в качестве клеток-хозяев для фаговых вирусов можно использовать бактериальные клетки, например E. coli LE392. К эукариотическим клеткам, которые можно использовать в качестве клеток-хозяев, без ограничений, относятся дрожжи (например, YPH499, YPH500 и YPH501), клетки насекомых и млекопитающих. Примеры эукариотических клеток-хозяев млекопитающих для репликации и/или экспрессии вектора включают, в частности, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, CHO, Saos и PC12.

Клетки-хозяева по настоящему изобретению включают Т-клетки и клетки-натуральные киллеры, которые содержат последовательности ДНК или РНК, кодирующие CAR, и которые экспрессируют CAR на клеточной поверхности. Клетки-хозяева можно использовать для повышения активности Т-клеток, активности клеток-натуральных киллеров, лечения рака и лечения аутоиммунных заболеваний.

Термин «пролиферация» относится к увеличению деления клеток, симметричному или асимметричному разделению клеток. Термин «рост» обозначает результат деления и гибели клеток.

Термин «дифференциация» относится к способу уменьшения потенциала или пролиферации клетки или перемещения клетки в состояние, более ограниченное с точки зрения развития.

Термины «экспрессировать» и «экспрессия» означают разрешение или обеспечение образования информации в гене или последовательности ДНК, например, получение белка путем активации клеточных функций, участвующих в транскрипции

и трансляции соответствующего гена или последовательности ДНК. Последовательность ДНК экспрессируется в клетке или клеткой с образованием «продукта экспрессии», такого как белок. Сам продукт экспрессии, например, полученный белок, может также называться «экспрессированным» клеткой. Продукт экспрессии можно охарактеризовать как внутриклеточный, внеклеточный или трансмембранный.

Термин «трансфекция» означает введение «чужеродной» (т. е. внешней или внеклеточной) нуклеиновой кислоты в клетку с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Термин «генетическая модификация» обозначает внедрение «чужеродного» (т. е., внешнего или внеклеточного) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку-хозяина таким образом, чтобы клетка-хозяин экспрессировала введенный ген или последовательность для получения желаемого вещества, обычно белка или фермента, кодируемого введенным геном или последовательностью. Введенный ген или последовательность можно также назвать «клонированным» или «чужеродным» геном или последовательностью, могут включать регуляторные или контрольные последовательности, функционально связанные с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор, такие как последовательность запуска, последовательность остановки, промотор, сигнальная последовательность, секреторная последовательность или другие последовательности, используемые генетическим механизмом клетки. Ген или последовательность могут включать нефункциональные последовательности или последовательности без известной функции. Клетка-хозяин, принимающая и экспрессирующая ДНК или РНК, является «генетически сконструированной». ДНК или РНК, введенная в клетку-хозяина, может поступать из любого источника, включая клетки одного рода или вида, выступающего в качестве клетки-хозяина, или разных родов или видов.

Термин «трансдукция» обозначает введение чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием вирусного вектора.

Термин «регуляторный элемент» относится к любому генетическому элементу, действующему в цис-положении, который контролирует некоторые аспекты экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления термин «промотор» включает по существу минимальные последовательности, необходимые для инициации транскрипции. В некоторых вариантах осуществления термин «промотор» включает последовательности для начала транскрипции и, кроме того, также включает последовательности, которые

могут повышать или снижать транскрипцию, обычно называемые «энхансерными элементами» и «репрессорными элементами» соответственно.

В настоящем документе термин «функционально соединенный», «функционально связанный» и аналогичные фразы, при их использовании в отношении нуклеиновых кислот или аминокислот, относятся к фактической связи последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотной последовательности соответственно в функциональных отношениях друг с другом. Например, функционально связанные промотор, элементы энхансера, открытая рамка считывания, 5' и 3' UTR и последовательности терминатора обеспечивают безошибочную продукцию молекулы нуклеиновой кислоты (например, РНК). В некоторых вариантах осуществления функционально связанные элементы нуклеиновых кислот приводят к транскрипции открытой рамки считывания и, в конечном счете, к продукции полипептида (т. е. к экспрессии открытой рамки считывания). В другом примере функционально связанным полипептидом является тот, в котором функциональные домены разнесены на надлежащее расстояние друг от друга, чтобы обеспечить реализацию искомой функции для каждого домена.

Термины «лечить» или «лечение» относятся к терапевтическому лечению, при котором у объекта должно происходить замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или заболевания, или которое обеспечивает благоприятный или желательный клинический результат во время лечения. Благоприятные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и (или) ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин «лечение» может также означать продление выживаемости по сравнению с выживаемостью, ожидаемой в случае, если субъект не получает лечение. К требующим лечения относятся субъекты, у которых уже отмечаются нежелательные физиологические изменения или заболевание, а также субъекты, склонные к физиологическим изменениям или заболеванию.

При употреблении в контексте данного документа термин «субъект» относится к животному. Термины «субъект» и «пациент» в данном документе могут употребляться взаимозаменяемо по отношению к субъекту. Таким образом, «субъект» включает в себя человека, выступающего в качестве пациента, которого лечат от

заболевания или у которого предупреждают заболевание. Описанные в данном документе способы можно применять для лечения субъекта-животного, относящегося к любой системе классификации. Примеры таких животных включают в себя млекопитающих. Млекопитающие включают, без ограничения, млекопитающих

5 отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики. Млекопитающие могут быть из отряда Carnivora, включая Felines (кошки) и Canines (собаки). Млекопитающие могут быть из отряда Artiodactyla, включая крупный рогатый скот (коровы) и свиней (свины), или отряда Perssodactyla, включая лошадиных (лошади). Млекопитающие могут относиться к отряду Primates,

10 Ceboids или Simoids (обезьяны), или к отряду Anthropoids (люди и человекообразные обезьяны). В одном варианте осуществления данного изобретения млекопитающее представляет собой человека.

Под терминами «усиливать» или «стимулировать», или «увеличивать», или «расширять», или «улучшать» в общем случае понимается способность

15 рассматриваемой в настоящем документе композиции производить, оказывать или вызывать больший физиологический ответ (например, последующие эффекты) по сравнению с ответом, вызываемым либо несущей средой, либо контрольной молекулой/композицией. Поддающийся измерению физиологический ответ может включать увеличение размножения Т-клеток, их активацию, эффекторную функцию,

20 устойчивость и/или увеличение способности уничтожать раковые клетки, среди прочего, очевидного из понимания в данной области техники и описания в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления «увеличенное» или «повышенное» количество может быть «статистически значимым» количеством и может включать увеличение, которое в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30

25 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные доли между и выше 1, например 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) превышает ответ, индуцируемый несущей средой или контрольной композицией.

Под «уменьшать» или «снижать», или «сокращать», или «убавлять», или «ослаблять» обычно понимают способность композиции, рассматриваемой в

30 настоящем документе, продуцировать, воздействовать или вызывать менее сильный физиологический ответ (т. е. эффекты на последующих стадиях) по сравнению с ответом, вызванным либо носителем, либо контрольной молекулой/композицией. В некоторых вариантах осуществления «уменьшенное» или «сокращенное» количество может быть «статистически значимым» количеством и может включать понижение,

которое составляет в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз низкий (например, 500, 1000 раз) (включая все целые и десятичные числа между и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) ответ (контрольный ответ), полученный носителем, контрольной композицией, или ответ в конкретной клеточной линии.

5 Термин «рак» обозначает широкую группу различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводят к образованию злокачественных опухолей, которые прорастают в соседние ткани и также могут метастазировать в
10 отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки. «Рак» или «раковая ткань» может включать в себя опухоль.

Термин «рецидивирующий» относится к повторному возникновению заболевания или признаков и симптомов заболевания после периода улучшения после предшествующего лечения терапевтическим средством.

15 Термин «рефрактерный» относится к заболеванию, которое не реагирует на лечение. Рефрактерное заболевание может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения или рефрактерное заболевание может стать устойчивым во время лечения.

Термин «опухолевая клетка» или «раковая клетка» относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо в культуре
20 тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфекцией трансформирующим вирусом и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты, поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты или она также может возникать спонтанно или после
25 воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Трансформация/рак проявляются в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, модулировании уровней маркера, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли у приемлемых животных-хозяев, таких как бестимусные
30 мыши и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.

Термин «эффективный», применяемый к дозе или количеству, относится к такому количеству соединения или фармацевтической композиции, которого достаточно для достижения желательной активности при введении субъекту, нуждающемуся в этом. Следует отметить, что при введении комбинации активных

ингредиентов эффективное количество комбинации может включать в себя или не включать в себя количества каждого ингредиента, которые были бы эффективны при введении по отдельности. Точное необходимое количество будет варьировать от субъекта к субъекту в зависимости от вида, возраста и общего состояния данного субъекта, тяжести подлежащего лечению патологического состояния, конкретного применяемого лекарственного средства или средств, способа введения и т. п.

Термины «предотвращать», «предотвращение», «предупреждение» или «профилактика» заболевания или расстройства означают предотвращение возникновения у субъекта расстройства.

Термины «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество», которые являются взаимозаменяемыми в настоящем документе, относятся к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Пример показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают, например, улучшение состояния здоровья пациента, сокращение размера опухоли, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие участки организма.

Фраза «фармацевтически приемлемый», используемая в связи с композициями, описанными в настоящем документе, относится к молекулярным единицам и другим ингредиентам таких композиций, которые являются физиологически переносимыми и обычно не продуцируют нежелательные реакции при введении млекопитающему (например, человеку). Предпочтительно, термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства США или правительства штата США, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у млекопитающих, в частности – у человека.

Используемый в данном документе термин «белок» охватывает все виды встречающихся в природе и синтетических белков, включая белковые фрагменты всех длин, слитых белков и модифицированных белков, включая, без ограничений, гликопротеины, а также все другие типы модифицированных белков (например, белки,

полученные в результате фосфорилирования, ацетилирования, миристотилирования, пальмитоилирование, гликозилирования, окисления, формования, амидирования, полиглутамилирования, АДФ-рибозилирования, пегилирования, биотинилирования и т. д.).

5 Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеотид» и «полинуклеотид» охватывают как ДНК, так и РНК, если не указано иное. Под «последовательностью нуклеиновой кислоты» или «нуклеотидной последовательностью» подразумевается нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоту; эти термины могут также относиться к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей участок, кодирующий любые
10 аминокислоты, добавляемые в качестве артефактов клонирования, включая любые аминокислоты, кодируемые линкерами.

 Термин «выделенный» относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды или полипептиды), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные
15 молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин «выделенное» относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены с большей чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,
20 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

 Термин «носитель» относится к разбавителю, вспомогательному веществу, эксципиенту или несущей среде, вместе с которыми вводят соединение. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла
25 животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Воду или водные солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина предпочтительно используют в качестве носителей, особенно для растворов для инъекций. Альтернативно носитель может представлять собой твердую дозированную
30 лекарственную форму, включая, без ограничений, одно или более связующих веществ (для прессованных таблеток), скользящее вещество, инкапсулирующий агент, ароматизатор и краситель. Приемлемые фармацевтические носители описаны в работе «Remington's Pharmaceutical Sciences», автор — E. W. Martin.

«Кластер дифференциации белка 79В» или «CD79b» относится к известным белкам, который также называют специфичным к В-клеткам гликопротеином B29, Ig-бета или AGM6. Рецептор антигена В-лимфоцитов представляет собой мультимерный комплекс, который включает антигенспецифический компонент, поверхностный иммуноглобулин (Ig), который нековалентно связан с Ig-альфа и Ig-бета. CD79b представляет собой белок Ig-бета антигена В-клеток. Все изоформы и варианты CD79b включены в термин «CD79b». При этом аминокислотные последовательности различных изоформ извлекают из номеров доступа GenBank АНАН32651.1, ЕАА94232.1, ААН02975.2, NP_000617.1 и NP_001035022.1. Аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности Cd79b показана ниже. Последовательность включает внеклеточный домен (остатки 29-159) и цитоплазматический домен (остатки 181-229).

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSA CSRIWQSPRFIARKR
GFTVKMHCYMN SASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGI
RFEDNGIYFCQQKCNNTSEVYQGC TELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLII
LFIIVIPFLLLDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQ
E (SEQ ID NO: 282)

Химерные антигенные рецепторы

Настоящее изобретение относится по существу к применению Т-клеток, генетически модифицированных для стабильной экспрессии желаемого химерного антигенного рецептора. Химерный антигенный рецептор (CAR) представляет собой искусственно сконструированный гибридный белок или полипептид, содержащий антигенсвязывающие домены антитела (scFv), связанные с сигнальными доменами Т-клеток. Характеристики CAR могут включать в себя их способность перенаправлять Т-клеточную специфичность и реактивность к выбранной мишени не ограниченным в отношении ГКГ образом с использованием антигенсвязывающих свойств моноклональных антител. Не ограниченное в отношении ГКГ распознавание антигена придает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антигены независимо от процессинга антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли от иммунного ответа. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с эндогенными альфа- и бета-цепями Т-клеточного рецептора (TCR).

CAR, описанные в настоящем документе, обеспечивают рекомбинантные полипептидные конструкции, содержащие по меньшей мере внеклеточный

антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (также называемый в данном документе «цитоплазматическим сигнальным доменом»), содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже. Т-клетки, экспрессирующие CAR, называются в данном документе CAR Т-клетками, CAR-Т-клетками или CAR-модифицированными Т-клетками, и данные термины употребляются в данном документе взаимозаменяемо. Клетка может быть генетически модифицирована таким образом, чтобы стабильно экспрессировать на своей поверхности связывающий домен антитела, придавая новую антигенную специфичность, которая не зависит от ГКГ.

В некоторых случаях Т-клетку генетически модифицируют для стабильной экспрессии CAR, который объединяет домен распознавания антигена специфического антитела с внутриклеточным доменом дзета-цепи CD3 или белка FcγRI в один химерный белок. В одном варианте осуществления стимулирующая молекула представляет собой дзета-цепь, ассоциированную с Т-клеточным рецепторным комплексом.

Используемый в данном документе термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к внутриклеточному участку молекулы. Именно функциональный участок белка действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или действуя как эффекторы, отвечая на такие мессенджеры. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например, CAR-Т-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, например, в CAR-Т-клетке, относится цитолитическая активность и хелперная активность, включая секрецию цитокинов.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. К примерам первичных внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или антиген-независимую стимуляцию. Например, в случае CAR-Т первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность Т-

клеточного рецептора, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность корецептора или костимулирующей молекулы.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. К примерам последовательностей первичной цитоплазматической сигнализации, содержащих ITAM, относятся, помимо прочего, производные CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d DAP10 и DAP12.

Термин «дзета» или альтернативно «дзета-цепь», «CD3-дзета » или «TCR-дзета» определяется как белок, представленный по номеру доступа GenBank BAG36664.1, или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, кролика, примата, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., и «стимулирующий домен дзета», или альтернативно «стимулирующий домен CD3-дзета», или «стимулирующий домен TCR-дзета» определяется как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена дзета-цепи, которые достаточны для функциональной передачи исходного сигнала, необходимого для активации Т-клетки. В одном аспекте цитоплазматический домен дзета содержит остатки от 52 до 164 согласно номеру доступа в GenBank BAG36664.1 или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., которые представляют собой их функциональные ортологи. В одном аспекте «стимулирующий домен дзета» или «стимулирующий домен CD3-дзета » представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 41.

Термин «костимулирующая молекула» относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя, таким образом, костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация. Костимулирующие молекулы являются молекулами клеточной поверхности, отличными от рецепторов антигенов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие

молекулы включают, без ограничений, молекулу MHC класса 1, BTLA и Toll-подобный рецептор, а также OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137).

5 Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточный участок костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: Белки рецептора ФНО, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. К примерам подобных молекул относятся CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, 10 GITR, CD30, MyD88, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83 и т. п.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать весь внутриклеточный участок или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой 15 он был получен, или его функциональный фрагмент.

Термин «4-1BB» или альтернативно «CD137» относится к члену суперсемейства РФНО с аминокислотной последовательностью, представленной по номеру доступа GenBank AAA62478.2, или эквивалентными остатками, полученными от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, 20 человекообразной обезьяны и т. п.; и «костимулирующий домен 4-1BB» определяется как аминокислотные остатки 214-255 с номером доступа в GenBank: AAA62478.2 или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п. В одном аспекте «костимулирующий домен 4-1BB» или «костимулирующий домен CD137» 25 представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., или последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по 30 меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В еще одном

варианте осуществления трансмембранный домен может быть выбран из или модифицирован посредством аминокислотного замещения во избежание связывания таких доменов с их трансмембранными доменами или различными белками поверхностной мембраны для сведения к минимуму взаимодействий с другими членами комплекса рецепторов. В одном примере осуществления трансмембранный домен содержит шарнирный домен CD8 α .

В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или более функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, как определено в данном документе. В одном варианте осуществления костимулирующая молекула выбрана из 4-1BB (т. е., CD137), CD27, CD3-дзета и/или CD28. CD28 является Т-клеточным маркером, важным для Т-клеточной костимуляции. CD27 является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли и выступает в качестве костимулирующей молекулы иммунной контрольной точки. 4-1BB передает мощный костимулирующий сигнал на Т-клетки, стимулируя дифференцировку и повышая долгосрочную выживаемость Т-лимфоцитов. CD3-дзета связывается с TCR для генерации сигнала и содержит иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM). В другом варианте осуществления костимулирующая молекула представляет собой MyD88 или CD40.

В одном варианте осуществления CAR содержит внутриклеточный шарнирный домен, включающий CD8 α , и внутриклеточный сигнальный домен рецептора Т-клеток, содержащий CD28, 4-1BB и CD3-дзета. В другом варианте осуществления CAR содержит внутриклеточный шарнирный домен и внутриклеточный сигнальный домен рецептора Т-клеток, содержащий CD28, 4-1BB и CD3-дзета, причем шарнирный домен содержит всю внеклеточную область CD8, CD4 или CD28 или ее часть; всю константную область антитела или ее часть; весь Fc γ RIIIa рецептор или его часть, всю шарнирную область IgG, шарнирную область IgM, шарнирную область IgA, шарнирную область IgD, шарнирную область IgE или шарнирную область Ig или части этих областей. Шарнирная область IgG может быть получена из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1, IgM2, IgA1, IgA2, IgD, IgE или их химеры.

CAR, описанные в данном документе, обеспечивают рекомбинантные полипептидные конструкции, содержащие по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (также называемый в данном документе «цитоплазматическим сигнальным

доменом»), например содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже.

В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и
 5 внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный
 10 сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по
 15 меньшей мере два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы.

CAR по настоящему изобретению могут быть сконструированы так, чтобы содержать сигнальный домен CD28 и/или 4-1BB по отдельности или быть
 20 объединенными с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(-ами), пригодным в контексте CAR по изобретению. В одном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR может дополнительно содержать сигнальный домен CD3-дзета. Например, цитоплазматический домен CAR может включать, без
 25 ограничений, сигнальные модули CD3-дзета, 4-1BB и CD28 и их комбинации. Соответственно, в изобретении предложены CAR Т-клетки и способы их применения в адоптивной терапии.

В изобретении дополнительно предложены варианты, например, функциональные варианты, для CAR, нуклеиновых кислот, полипептидов и белков, описанных в данном документе. Термин «вариант» относится к полипептиду или
 30 полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификаций, например замен, вставок или делеций. Используемый в данном документе термин «функциональный вариант» относится к CAR, полипептиду или белку, имеющему существенную или значительную идентичность последовательности или сходство с исходным CAR, полипептидом или белком, причем функциональный вариант сохраняет биологическую активность CAR,

полипептида или белка, для которого он является вариантом. Функциональные варианты включают, например, те варианты CAR, полипептида или белка, которые описаны в данном документе (исходный CAR, полипептид или белок), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в аналогичной степени, в той же

5 степени или в большей степени, как и исходный CAR, полипептид или белок. По отношению к исходному CAR, полипептиду или белку функциональный вариант может быть, например, на по меньшей мере около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%,

около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более

10 идентичен по аминокислотной последовательности исходному CAR, полипептиду или белку.

Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность исходного CAR, полипептида или белка с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. В другом варианте осуществления

15 функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность исходного CAR, полипептида или белка с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В данном случае неконсервативная аминокислотная замена может не препятствовать или не ингибировать биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может

20 усиливать биологическую активность функционального варианта таким образом, что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с исходным CAR, полипептидом или белком.

Аминокислотные замены в обладающих признаками изобретения CAR могут быть консервативными аминокислотными заменами. Консервативные аминокислотные

25 замены известны в данной области техники и включают аминокислотные замены, при которых одну аминокислоту, имеющую определенные физические и/или химические свойства, заменяют на другую аминокислоту, обладающую такими же или аналогичными химическими или физическими свойствами. Например, консервативная аминокислотная замена может быть кислой аминокислотой, замещенной другой

30 кислой аминокислотой (например, Asp или Glu), аминокислотой с неполярной боковой цепью, замещенной другой аминокислотой с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val и т. д.), основной аминокислотой, замещенной другой основной аминокислотой (Lys, Arg и т. д.), аминокислотой с

полярной боковой цепью, замещенной другой аминокислотой с полярной боковой цепью (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr и т. д.), и т. д.

CAR, полипептид или белок могут состоять по существу из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, так что другие компоненты, например, другие аминокислоты, существенно не изменяют биологическую активность функционального варианта.

CAR, полипептиды и белки вариантов осуществления изобретения (включая функциональные участки функциональные варианты) могут иметь любую длину, т. е. могут содержать любое количество аминокислот, при условии что CAR, полипептиды или белки (или их функциональные участки, или их функциональные варианты) сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфически связываться с антигеном, обнаруживать пораженные клетки (например, раковые клетки) в организме-хозяине, или лечить или предотвращать заболевание в организме-хозяине и т. д. Например, полипептид может иметь длину от около 50 до около 5000 аминокислот, например, около 50, около 70, около 75, около 100, около 125, около 150, около 175, около 200, около 225, около 250, около 275, около 300, около 325, около 350, около 375, около 400, около 425, около 450, около 475, около 500, около 525, около 550, около 575, около 600, около 625, около 650, около 675, около 700, около 725, около 750, около 775, около 800, около 825, около 850, около 875, около 900, около 925, около 950, около 975, около 1000 или более аминокислот. Полипептиды по изобретению также включают олигопептиды.

CAR, полипептиды и белки по вариантам осуществления изобретения (включая функциональные участки и функциональные варианты по изобретению) могут содержать синтетические аминокислоты вместо одной или более природных аминокислот. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области техники и включают, например, аминокислоты циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α -амино-н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинотимотионин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, α -(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту, α,γ -диаминомасляную кислоту, α,β -диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β -фенилсерин β -гидроксифенилаланин, фенилглицин, α -нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, N'-бензил-N'-метил-лизин, N',N'-дибензил-лизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α -аминоциклопентан-карбоновую кислоту, α -аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α -аминоциклопентанкарбоновую

кислоту, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты и α -трет-бутилглицин.

CAR, полипептиды и белки согласно вариантам осуществления изобретения (включая функциональные участки и функциональные варианты) могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Они могут быть гликозилированными, этерифицированными, N-ацилированными, амидированными, карбоксилированными, фосфорилированными, этерифицированными, циклизированными посредством, например, дисульфидного мостика или превращены в кислотно-аддитивную соль. В некоторых вариантах осуществления они димеризованы, или полимеризованы, или конъюгированы.

CAR, полипептиды и/или белки согласно вариантам осуществления изобретения (включая функциональные участки и их функциональные варианты) могут быть получены способами, известными в данной области техники. Подходящие способы синтеза *de novo* полипептидов и белков описаны в публикациях, таких как Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; и *Epitope Mapping*, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001. Кроме того, полипептиды и белки могут быть получены рекомбинантным способом с использованием нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, с использованием стандартных рекомбинантных способов. См., например, публикацию Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. Кроме того, некоторые из CAR, полипептидов и белков согласно изобретению (включая их функциональные участки и их функциональные варианты) могут быть выделены и/или очищены из источника, такого как растение, бактерия, насекомое, млекопитающее и т. д. Способы выделения и очистки известны в данной области техники. Альтернативно CAR, полипептиды и/или белки, описанные в данном документе (включая их функциональные участки и их функциональные варианты), могут быть синтезированы на коммерческой основе. В этом отношении CAR, полипептиды и белки могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

Примеры модифицированных нуклеотидов, которые могут быть использованы для получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, используемых для получения

полипептидов, описанных в данном документе, включают, без ограничений, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил) урацил, карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, N⁶-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5''-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N⁶-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксизин, псевдоурацил, квеозин, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N⁶-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил) урацил и 2,6-диаминопурин.

Нуклеиновая кислота может содержать любую выделенную или очищенную нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из CAR, полипептидов, или белков, или их функциональных участков, или их функциональных вариантов. Альтернативно нуклеотидная последовательность может содержать последовательность, вырожденную в любую из последовательностей или комбинацию вырожденных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложена выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, или нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Нуклеотидная последовательность, которая гибридизируется в жестких условиях, может гибридизоваться в условиях высокой жесткости. Под «условиями высокой жесткости» понимается, что нуклеотидная последовательность специфически гибридизируется с целевой последовательностью (нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе) в степени, обнаружимой сильнее, чем неспецифическая гибридизация. Условия высокой жесткости включают условия, которые позволяют различить полинуклеотид с точно комплементарной последовательностью или полинуклеотид, содержащий только несколько разбросанных несовпадений из случайной последовательности, которая имеет несколько небольших областей (например, 3–12 оснований), которые

соответствуют нуклеотидной последовательности. Такие небольшие области комплементарности легче расплавляются, чем полноразмерный комплемент из 14–17 или более оснований, и гибридизация с высокой жесткостью делает их легко различимыми. Условия относительно высокой жесткости будут включать, например, условия с низким содержанием соли и/или высокой температурой, такие как 5 обеспечиваемые около 0,02–0,1 М NaCl или его эквивалентом, при температурах примерно 50–70 °С. Такие условия высокой жесткости допускают небольшое несоответствие между нуклеотидной последовательностью и матрицей или целевой цепью, если таковое имеется, или особенно подходят для обнаружения экспрессии 10 любого из CAR, описанных в данном документе. Как правило, считается, что условия можно сделать более жесткими путем добавления возрастающих количеств формамида.

В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению можно встраивать в рекомбинантный экспрессионный вектор. В настоящем описании 15 обеспечены рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из нуклеиновых кислот по изобретению. Используемый в данном документе термин «рекомбинантный вектор экспрессии» означает генетически модифицированный олигонуклеотидный или полинуклеотидный конструкт, который обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, когда конструкт содержит нуклеотидную 20 последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, а вектор приводят в контакт с клеткой в условиях, достаточных для экспрессии мРНК, белка, полипептида или пептида внутри клетки. Описанные в данном документе векторы не встречаются в природе в целом; однако части векторов могут быть природного происхождения. Описанные рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать 25 нуклеотиды любого типа, включая, без ограничений, ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, синтезированными или частично полученными из природных источников и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды. Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать межнуклеотидные связи природного происхождения или 30 неприродного происхождения или оба типа связей. Неприродные или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

В варианте осуществления рекомбинантный вектор экспрессии по изобретению может быть любым приемлемым рекомбинантным вектором экспрессии и может быть

использован для трансформации или трансфекции любого приемлемого хозяина. Приемлемые векторы включают векторы, предназначенные для размножения и экспансии или для экспрессии, или и того, и другого, такие как плазмиды и вирусы. Вектор может быть выбран из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences, Глен Берни, штат Мэриленд, США), серии pBluescript (Stratagene, г. Ла-Холья, штат Калифорния, США), серии pET (Novagen, г. Мэдисон, штат Висконсин, США), серии pGEX (Pharmacia Biotech, г. Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Можно использовать векторы бактериофагов, такие как λ GT10, λ GT11, λ EMBL4 и λ NM1149, λ ZapII (Stratagene). Примеры векторов экспрессии растений включают pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии на животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). Рекомбинантный вектор экспрессии может быть вирусным вектором, например ретровирусным вектором, например гамма-ретровирусным вектором.

В одном варианте осуществления рекомбинантные экспрессионные векторы по изобретению получают с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, описанных, например, в Sambrook et al., выше, и Ausubel et al., выше. Могут быть получены конструкторы векторов экспрессии, которые являются кольцевыми или линейными, чтобы они содержали систему репликации, функционирующую в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColE1, SV40, 2 μ плазмиды, λ , вируса бычьей папилломы и т. п.

Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать регуляторные последовательности, такие как иницирующие и терминирующие кодоны транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа хозяина (например, бактерии, растения, гриба или животного), в который должен быть введен вектор, при необходимости, при этом учитывается, основан ли вектор на ДНК или РНК.

Рекомбинантный вектор экспрессии может включать один или более маркерных генов, которые позволяют отбирать трансформированные или трансфицированные организмы-хозяева. Маркерные гены включают гены резистентности к биоцидам, например гены резистентности к антибиотикам, тяжелым металлам и т. д., комплементации в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофности и т. п. Приемлемые маркерные гены для описанных векторов экспрессии включают, например, гены резистентности к неомицину/G418, гены резистентности к

гистидинолу X, гены резистентности к гистидинолу, гены резистентности к тетрациклину и гены резистентности к ампициллину.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может содержать нативный или нормальный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR, полипептид или белок (включая их функциональные участки и их функциональные варианты), или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR, полипептид или белок. Выбор промоторов, например сильных, слабых, тканеспецифичных, индуцируемых и специфичных для развития промоторов находится в рамках квалификации обычного специалиста в данной области техники. Аналогичным образом комбинирование нуклеотидной последовательности с промотором также находится в рамках квалификации специалиста в данной области техники. Промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, например промотор цитомегаловируса (CMV), промотор RSV, промотор SV40 или промотор, присутствующий в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток.

Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать один или более дополнительных регуляторных элементов, таких как энхансерные элементы, 5'- и 3'-UTR или концевые последовательности, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR, полипептидом или белком (включая его функциональные части и функциональные варианты) или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR, полипептид или белок.

Рекомбинантные векторы экспрессии могут быть разработаны либо для транзientной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обоих типов. Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

Дополнительно могут быть созданы рекомбинантные векторы экспрессии, включающие суицидальный ген. Используемый в данном документе термин «суицидальный ген» относится к гену, который заставляет клетку, экспрессирующую суицидальный ген, погибать. Суицидальный ген может быть геном, который придает чувствительность к агенту, например лекарственному средству, клетке, в которой экспрессируется ген, и заставляет клетку погибать, когда клетку приводят в контакт с агентом или она подвергается его воздействию. Суицидальные гены известны в данной

области и включают, например, ген тимидинкиназы (ТК) вируса простого герпеса (HSV), цитозиндезаминазу, пурин-нуклеозидфосфорилазу и нитроредуктазу.

В объем изобретения входят конъюгаты, например, биоконъюгаты, содержащие любые CAR, полипептиды или белки (включая любые их функциональные участки или варианты), клетки-хозяева, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, популяции клеток-хозяев или антитела, или их антигенсвязывающие участки. Конъюгаты, а также способы синтеза конъюгатов в целом известны в данной области техники (см., например, Hudez, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) и Kirin et al., *Inorg Chem.* 44(15): 5405 - 5415 (2005)).

В варианте осуществления изобретения дополнительно предложено антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывается, например, специфически связывается с эпитопом CAR согласно изобретению.

Антитело может представлять собой любой тип иммуноглобулина, известный в данной области техники. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам — IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяют на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител у позвоночных можно отнести к одному из двух типов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Антитело может относиться к любому классу или изотипу.

Антитела включают молекулы иммуноглобулина, включая моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, поликлональные, антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические или полиспецифические антитела, мономерные, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт необходимой специфичности. Антитело может быть природным антителом, например антителом, выделенным и/или очищенным от млекопитающего, например приматов, мышей, кроликов, коз, лошадей, кур, хомяков, людей и т. д. Альтернативно антитело может быть сконструированным (например, генетически сконструированным) антителом.

Гуманизированные антитела имеют антигенсвязывающие сайты, полученные из видов, отличных от человека, а каркасные области переменной области получены из последовательностей иммуноглобулинов человека. Термин «антитела человека» относится к антителам, имеющим переменные области тяжелой и легкой цепей, в

которых как каркасные области, так и антигенсвязывающие сайты получены из последовательностей человеческого происхождения.

Кроме того, антитело может иметь любой уровень аффинности или авидности к функциональному участку CAR. В некоторых вариантах осуществления антитело может связывать антиген CD79b в диапазоне аффинностей (K_D). В одном варианте осуществления согласно изобретению и в некоторых вариантах осуществления каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело связывается с антигеном CD79b с высокой аффинностью, например, с значением K_D , равным или менее около 10^{-7} М, например, но не ограничиваясь этим, 1–9,9 (или в любом входящем в него диапазоне или значении, таком как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, или 9) $\times 10^{-8}$ М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М, 10^{-14} М, 10^{-15} М или соответствующим любому входящему в данный интервал диапазону или значению, определяемым методом поверхностного плазмонного резонанса или методом Kіnexа, как практикуется специалистами в данной области техники. В одном примере аффинность равна или менее 1×10^{-8} М. В другом примере аффинность равна или менее 1×10^{-9} М.

Способы тестирования антител на способность связываться с любым функциональным участком CAR известны в данной области техники и включают любой анализ связывания антитело-антиген, такой как, например, радиоиммуноанализ (РИА), вестерн-блоттинг, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунопреципитация и анализы конкурентного ингибирования.

Приемлемые способы получения антител известны в данной области техники. Например, стандартные способы гибридомы описаны в публикациях, например, Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511–519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), и C. A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, N.Y. (2001)). Альтернативно другие способы, такие как способы гибридомы EBV (Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361–67 (1984), и Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121, 140–67 (1986)), и экспрессионные системы векторов на основе бактериофага (см., например, Huse et al., *Science*, 246, 1275–81 (1989)) известны в данной области техники. Кроме того, способы получения антител у животных, кроме человека, описаны, например, в патентах США № 5,545,806, 5,569,825 и 5,714,352 и публикации заявки на патент США № 2002/0197266 A1).

Для получения антитела можно также использовать фаговый дисплей. В этом отношении фаговые библиотеки, кодирующие антигенсвязывающие переменные (V)

домены антител, могут быть созданы с использованием стандартных методов молекулярной биологии и рекомбинантных ДНК (см., например, Sambrook et al., Выше, и Ausubel et al., выше). Фаг, кодирующий вариабельную область с желаемой специфичностью, выбирают для специфического связывания с желаемым антигеном (т.е. CD79b), и восстанавливают полное или частичное антитело, содержащее
 5 выбранный вариабельный домен. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие восстановленное антитело, вводятся в подходящую линию клеток, такую как миеломная клетка, которая используется для получения гибридомы, так что антитела, имеющие характеристики моноклональных антител, секретируются этой
 10 клеткой (см., например, Janeway et al., выше, Huse et al., выше и в патенте США № 6265150).

Антитела могут быть получены с помощью трансгенных мышей, которые являются трансгенными по конкретным генам тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Такие способы известны в данной области техники и описаны,
 15 например, в патентах США №№ 5545806 и 5569825 и Janeway et al. выше.

Способы создания гуманизированных антител известны в данной области техники и описаны, например, в Janeway et al., выше, патенте США №№ 5225539, 5585089 и 5693761, европейском патенте № 0239400 В1 и патенте Великобритании № 2188638. Гуманизированные антитела также могут быть получены с использованием
 20 технологии изменения поверхности антител, описанной в патентах США № 5639641 и Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235, 959-973 (1994).

Используемые в данном документе антитела могут быть многоцепочечными, или одноцепочечными, или интактными иммуноглобулинами и могут быть получены из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут быть
 25 тетрамерами молекул иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифическое антитело. Области VL и/или VH существующих антител или области VL и VH, идентифицированные de novo, как описано в данном документе, могут быть сконструированы с получением биспецифических полноразмерных антител. Такие
 30 биспецифические антитела могут быть получены путем модуляции взаимодействий СНЗ в Fc антител с образованием биспецифических антител с помощью методик, таких как описанные в патенте США № 7,695,936; межд. публ. пат. № WO04/111233; публ. пат. США № 2010/0015133; публ. пат. США № 2007/0287170; межд. публ. пат. № WO2008/119353; публ. пат. США № 2009/0182127; публ. пат. США

№ 2010/0286374; публ. пат. США № 2011/0123532; межд. публ. пат. № WO2011/131746; межд. публ. пат. № WO2011/143545; или патентной публикации США № 2012/0149876. Например, биспецифические антитела согласно изобретению можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в области СНЗ двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстанавливающих условиях для обеспечения изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной публ. пат. № WO2011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене СНЗ, обеспечивающие стабильность гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невозстанавливающим. Примерами восстанавливающих агентов, которые можно использовать, являются 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозритрит (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно применять инкубацию в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °C в присутствии по меньшей мере 25 mM 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 mM дитиотреитола при pH от 5 до 8, например, при pH 7,0 или при pH 7,4.

Термин «фрагмент антитела» относится по меньшей мере к одному участку интактного антитела или его рекомбинантных вариантов, которые сохраняют антигенсвязывающие свойства исходного полноразмерного антитела. Он относится, например, к антигенсвязывающему домену, например, к антигенной определяющей переменной области интактного антитела, которая достаточна для распознавания и связывания, например, специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к участку молекулы иммуноглобулина. Примеры фрагментов антитела включают, без ограничений, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, одноцепочечные антитела (scFv),

линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (VL или VH), домены VHH верблюдовых и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин scFv относится к белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменные области легкой и тяжелой цепей непрерывно связаны посредством короткого гибкого полипептидного линкера и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, и причем scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, в контексте данного документа scFv может иметь переменные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-терминального и C-терминального концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Домены VH и VL, идентифицированные в настоящем документе, могут быть включены в формат scFv, а связывание и термостабильность полученного scFv в отношении CD79b можно оценить с использованием известных способов. Связывание можно оценить с использованием оборудования ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, ИФА или анализов конкурентного связывания, известных специалистам в данной области. Связывание можно оценить с использованием очищенных супернатантов scFv или *E. coli* или лизированных клеток, содержащих экспрессированный scFv. Измеренное значение аффинности исследуемого scFv к CD79b может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярности, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, K_D , K_{on} , K_{off}), как правило, проводятся в стандартизированных условиях и с использованием стандартизированных буферов. Термостабильность можно оценить путем нагревания исследуемого scFv при повышенных температурах, например, при 50°C, 55°C или 60°C в течение периода времени, например, 5 минут (мин), 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин или 30 мин, и измерения связывания исследуемого scFv к CD79b. ScFv, сохраняющие сопоставимое связывание с CD79b по сравнению с образцом ненагретого scFv, называют термостабильными.

Антигенсвязывающий домен cD79b может содержать последовательности, кодирующие варианты, демонстрирующие улучшенную термостабильность по сравнению с исходным антителом SN8. Сконструированные положения, которые

могут обеспечивать улучшенную термостабильность, содержат остатки M12, I20, R40 и A79 в VH (нумерация остатков в соответствии с SN8_VH SEQ ID NO: 283) и L4, D32, F51, V82 и A87 в VL (нумерация остатков в соответствии с SN8_VL SEQ ID NO: 284).

В рекомбинантных системах экспрессии линкер представляет собой пептидный линкер и может включать любую природную аминокислоту. Иллюстративные аминокислоты, которые могут быть включены в линкер, представляют собой Gly, Ser, Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu, His и The. Линкер должен иметь длину, достаточную для связывания VH и VL таким образом, чтобы они формировали правильную конформацию относительно друг друга, чтобы они сохраняли желаемую активность, такую как связывание с CD79b.

Линкер может иметь длину около 5–50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–35 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10–20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 15–20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 9 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 11 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 12 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 14 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 17 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 19 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 21 аминокислота. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 22 аминокислоты. В некоторых вариантах

осуществления линкер имеет длину 23 аминокислоты. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 24 аминокислоты. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 25 аминокислот. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 26 аминокислот. В некоторых вариантах
 5 осуществления линкер имеет длину 27 аминокислот. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 28 аминокислот. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 29 аминокислот. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 30 аминокислот. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 31 аминокислота. В некоторых вариантах
 10 осуществления линкер имеет длину 32 аминокислоты. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 33 аминокислоты. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 34 аминокислоты. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 35 аминокислот. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 36 аминокислот. В некоторых вариантах
 15 осуществления линкер имеет длину 37 аминокислот. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 38 аминокислот. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 39 аминокислот. В некоторых вариантах
 осуществления линкер имеет длину 40 аминокислот. Иллюстративные линкеры,
 которые можно использовать, представляют собой богатые Gly линкеры, содержащие
 20 Gly и Ser, Gly и Ala линкеры, содержащие Ala и Ser линкеры и другие гибкие линкеры.

Другие последовательности линкеров могут включать участки шарнирной
 области иммуноглобулина CL или CH1, полученные из тяжелой или легкой цепей
 иммуноглобулина любого изотипа. Иллюстративные линкеры, которые можно
 использовать, приведены в **таблице 1**. Дополнительные линкеры описаны, например, в
 25 межд. публ. пат. № WO2019/060695.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к С-концу,
 VH, линкер и VL (VH-линкер-VL).

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к С-концу,
 VL, линкер и VH (VL-линкер-VH).

30 В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную
 последовательность с SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную
 последовательность с SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 62.

5 В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 64.

10 В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 67.

15 В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 69.

20 В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 72.

25 В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 74.

Таблица 1.

Название линкера	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Линкер 1	GGSEKSSGSGSESKSTGGS	42
Линкер 2	GGGSGGGS	43
Линкер 3	GGGSGGGS	44

Название линкера	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Линкер 4	GGGSGGGSGGGSGGGS	45
Линкер 5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	46
Линкер 6	GGGGSGGGSGGGGS	47
Линкер 7	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	48
Линкер 8	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	49
Линкер 9	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	50
Линкер 10	IRPRAIGGSKPRVA	51
Линкер 11	GKGGSGKGGSGKGGGS	52
Линкер 12	GGKGS GGKGS GGKGS	53
Линкер 13	GGGKSGGGKSGGGKS	54
Линкер 14	GKGKSGKGKSGKGKS	55
Линкер 15	GGGKSGGKSGKGGGS	56
Линкер 16	GKPGSGKPGSGKPGS	57
Линкер 17	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	58
Линкер 18	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	59
Линкер 19	STAGDTHLGGEDFD	60
Линкер 20	GEGSGEGSGEGGS	61
Линкер 21	GGEGSGEGSGGEGS	62
Линкер 22	GEGESGEGESGEGES	63
Линкер 23	GGGESGGEGSGEGGS	64
Линкер 24	GEGESGEGESGEGESGEGES	65
Линкер 25	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	66
Линкер 26	PRGASKSGSASQTGSAPGS	67
Линкер 27	GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	68
Линкер 28	GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	69
Линкер 29	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	70
Линкер 30	GSGS	71
Линкер 31	APAPAPAPAP	72
Линкер 32	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	73
Линкер 33	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA	74

В варианте осуществления изобретения также предложены антигенсвязывающие участки любого из антител, описанных в данном документе. Антигенсвязывающая часть может представлять собой любой участок, который имеет по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, например, Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, диатела и триатела.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты представляют собой определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и/или 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и/или 3, переменную область тяжелой цепи (VH), или переменную область легкой цепи (VL), фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv и доменные антитела (dAb), содержащие (например, состоящие из) либо один домен VH, либо один домен VL. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством линкера, например, синтетического линкера.

«Определяющие комплементарность области (CDR)» представляют собой «антигенсвязывающие сайты» в антителе. CDR можно определять с помощью различных терминов: (i) определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), основаны на изменчивости последовательности (Wu and Kabat, J Exp Med 132:211–50, 1970; Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) «гипервариабельные участки», HVR или HV, три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к областям переменных доменов антитела, являющихся по своей структуре гипервариабельными, согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, Mol. Biol 196:901–17, 1987). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://imgt.org>) представлены стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано в Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55–77, 2003. Термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» в настоящем документе включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Kabat, Chothia или IMGT, если в описании явным образом не указано иное.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий участок могут быть модифицированы, чтобы содержать детектируемую метку, такую как, например, радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена) и частицы элементов (например, частицы золота).

Примеры обнаруживаемых меток включают в себя радиоактивные изотопы, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентные красители, электроноплотные реагенты, ферменты (например, широко используемые в иммуноферментном анализе (ИФА)), биотин, дигоксигенин, гаптены, люминисцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, флуорохромы, флуорофоры, гасящие флуоресценцию агенты, цветные молекулы, радиоактивные изотопы, сцинтиллирующие средства, авидин, стрептавидин, белок А, белок G, антитела или их фрагменты, полигистидин, Ni²⁺, Flag-маркеры, тус-маркеры, тяжелые металлы, ферменты, щелочная фосфатаза, пероксидаза, люцифераза, доноры/акцепторы электронов, сложные эфиры акридиния и колориметрические субстраты.

Обнаруживаемая метка может испускать сигнал спонтанно, например, когда обнаруживаемая метка представляет собой радиоактивный изотоп. В других случаях обнаруживаемая метка испускает сигнал в результате стимуляции внешним полем.

Приемлемые красители включают в себя любые присутствующие на рынке красители, такие как, например, 5(6)-карбоксифлуоресцеин, малеимид IRDye 680RD или IRDye 800CW, красители на основе комплекса рутений/полипиридил и т. п. К приемлемым флуорофорам относятся флуоресцеин изотиоцианат (FITC), флуоресцеин тиосемикарбазид, родамин, Texas Red, красители CyDye (например, Cy3, Cy5, Cy5.5), красители Alexa Fluor (например, Alexa488, Alexa555, Alexa594; Alexa647), флуоресцентные красители ближнего ИК-диапазона (NIR) (700-900 нм) и карбоцианиновые и аминотирильные красители.

Также в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из CAR, полипептидов или белков, описанных в данном документе (включая их функциональные участки и их функциональные варианты).

Часть CAR, содержащая антитело или его фрагмент антитела, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется как участок непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb), scFv и химерное или гуманизированное антитело человека (Harlow et al., 1999, *In: Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow et al., 1989, *In: Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен

композиции CAR по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В одном аспекте CAR содержит фрагмент антитела, который содержит scFv.

Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое получают с применением технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом или системой экспрессии дрожжей. Термин также следует воспринимать как обозначающий антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и которая экспрессирует белок антитела, или аминокислотной последовательности, определяющей антитело, причем ДНК или аминокислотная последовательность были получены с применением технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и известной в данной области техники.

Термин «антиген» относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Этот иммунный ответ может предполагать или выработку антител, или активацию специфичных иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Более того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или часть нуклеотидной последовательности, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом кодирует «антиген» в том значении, в котором этот термин используется в данном документе. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не обязательно должен быть закодирован исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее описание включает, помимо прочего, применение частей нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности располагаются в различных комбинациях для того, чтобы кодировать полипептиды, которые вызывают желаемый иммунный ответ.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, при этом внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

а) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 1, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 19;

б) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 1, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 20;

в) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 2 и определяющую комплементарность область легкой цепи (CDR) 2, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 19;

г) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 2, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 20;

д) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 3, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 20;

е) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 4, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 19;

ж) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 5, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 22;

з) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 5, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 23;

и) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 6, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 24;

й) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 7, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 26;

к) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 8, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 25;

1) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH)
5 SEQ ID NO: 9, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи
(VL) SEQ ID NO: 27;

m) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 10, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 28;

10 n) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH)
SEQ ID NO: 11, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи
(VL) SEQ ID NO: 29;

о) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 12, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 30;

р) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 13, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 31;

q) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH)
20 SEQ ID NO: 14, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи
(VL) SEQ ID NO: 32;

г) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 15, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 33;

25 s) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH)
SEQ ID NO: 16, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи
(VL) SEQ ID NO: 34;

t) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 16, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 35;

у) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 17, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 33; или

v) CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 18, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 36.

5 В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR1 тяжелой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 14, и CDR1 легкой цепи, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 32.

10 В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 208, 216, 222, 228, 232, 238, 242, 248, 253, 257, 263, 268 и 274, и их консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

20 CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 209, 217, 223, 233, 239, 243, 249, 254, 258, 269 и 275, и их консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

25 В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 210, 218, 224, 229, 234, 240, 244, 250, 255, 259, 264, 270 и 276, и их консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

30 В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208, CDR2 тяжелой цепи, имеющую

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259;

5 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 243, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264;

10 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 269, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 270; или

15 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 275, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 276;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и
20 внутриклеточный сигнальный домен, при этом внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ
25 ID NO: 259.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

30 CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 211, 214, 215, 219, 225, 230, 235, 241, 245, 251, 260, 265, 271 и 277, и их консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

5 CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 212, 220, 226, 231, 236, 246, 261, 266 и 272, и их консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

10 В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 213, 221, 227, 237, 247, 252, 256, 262, 267, 273 или 278, и их консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

15 В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

20 CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213;

25 CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213;

30 CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221;

NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 267;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 271, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 272, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273; или

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 277, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, при этом внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность

a) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211, 212 и 213, соответственно;

b) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 214, 212 и 213, соответственно;

c) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 215, 212 и 213, соответственно;

d) SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220 и 221, соответственно;

e) SEQ ID NO: 222, 223, 224, 225, 226 и 227, соответственно;

f) SEQ ID NO: 228, 217, 229, 230, 231 и 221, соответственно;

g) SEQ ID NO: 232, 233, 234, 235, 236 и 237, соответственно;

h) SEQ ID NO: 238, 239, 240, 241, 226 и 227, соответственно;

i) SEQ ID NO: 242, 243, 244, 245, 246 и 247, соответственно;

j) SEQ ID NO: 248, 249, 250, 251, 236 и 252, соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 254, 255, 251, 236 и 256, соответственно;

- l) SEQ ID NO: 257, 258, 259, 260, 261 и 262, соответственно;
- m) SEQ ID NO: 263, 243, 264, 265, 266 и 267, соответственно;
- n) SEQ ID NO: 268, 269, 270, 271, 272 и 273, соответственно; или
- o) SEQ ID NO: 274, 275, 276, 277, 266 и 278, соответственно.

5 В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен включает CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, 258, 259, 260, 261 и 262, соответственно.

10 В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен включает

вариабельный домен (HCVH) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-18; или вариабельный домен (LCVL) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19-36, или комбинацию HCVH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-18, и LCVL, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-36.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, 15 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

20 В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

25 В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по 30 меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 14, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 32;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 15, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по

область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 33; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 36.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 14, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 32.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерный

полипептид между вариабельной областью легкой цепи и вариабельной областью тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75–118, и специфически связывается с полипептидом CD79b (например, полипептидом CD79b человека, имеющим аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, или его фрагментами). В некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-74.

В одном варианте линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. В одном варианте осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75-118. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86. В

осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по

меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 113.

5 В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит сигнальный полипептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В одном варианте осуществления сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 37.

15 В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-162. Другой признак CAR, имеющего внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-162, заключается в том, что внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

20 В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), члена суперсемейства дифференцировки (такого как, например, CD28 или компонента индуцируемого Т-клеточного костимулятора (ICOS)) и их комбинации.

В одном варианте осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В одном варианте осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по

меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В одном варианте осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 41.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 163.

В одном варианте осуществления трансмембранный домен включает полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В одном варианте осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 39.

В одном варианте осуществления трансмембранный домен включает по меньшей мере трансмембранную(-ые) область(-и) α -, β - или ζ -цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD40, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В другом варианте осуществления трансмембранный домен содержит по меньшей мере трансмембранный домен из ζ , η или Fc ϵ R1 γ и β , MB1 (Ig α), B29 или CD3- γ , ζ или η . В еще одном варианте осуществления трансмембранный домен является синтетическим, например,

содержащим преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин, триплет фенилаланина или триптофана.

В одном варианте осуществления CAR дополнительно содержит шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8a. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 285), или содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или на по меньшей мере на 99% идентична последовательности EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 285). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ERKCCVECPCPPCP (SEQ ID NO: 286), или содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или на по меньшей мере на 99% идентична последовательности ERKCCVECPCPPCP (SEQ ID NO: 286). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ELKTPGLGDTHTTCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (SEQ ID NO: 287) или содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по

меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности ELKTPGLDTHHTCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)₃ (SEQ ID NO: 287). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 288), или содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или на по меньшей мере на 99% идентична последовательности ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 288).

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-162. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична

идентична последовательности SEQ ID NO: 122. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере

одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ

ID NO: 124. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична

[illegible]

[illegible]

[illegible]

30

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157, или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по

меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или на по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 157.

Конструкции CAR и иммунореактивные клетки, экспрессирующие CAR

5 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR. В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164-207. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит

10 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ

15 ID NO: 164, или последовательность SEQ ID NO: 164. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по

20 меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 165, или последовательность SEQ ID NO: 165. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по

25 меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 166, или последовательность SEQ ID NO: 166. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по

30 меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична

[illegible]

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложены выделенные иммунореактивные клетки, содержащие CAR, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка трансдуцируется CAR, например, CAR конститутивно экспрессируется на поверхности иммунореактивной клетки. В определенных вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка дополнительно трансдуцируется по меньшей мере одним костимулирующим лигандом, так что иммунореактивная клетка экспрессирует по меньшей мере один костимулирующий лиганд. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один костимулирующий лиганд выбран из группы, состоящей из 4-1BBL, CD48, CD70, CD80, CD86, OX40L, TNFRSF14 и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка дополнительно трансдуцируется по меньшей мере одним цитокином, так что иммунореактивная клетка секретирует по меньшей мере один цитокин. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере цитокин выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-лимфоцита (Т-клетки), природной клетки-киллера (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), регуляторной Т-клетки, эмбриональной стволовой клетки человека, лимфоидной клетки-предшественника, клетки-предшественника Т-клетки и плюрипотентной стволовой клетки, из которой могут быть дифференцированы лимфоидные клетки.

В одном варианте осуществления клетки CAR-T по настоящему изобретению могут быть получены путем введения лентивирусного вектора, содержащего необходимый CAR, например, CAR, содержащий домен против CD79b, шарнирный и трансмембранный домен CD8 α , а также сигнальные домены 4-1BB и CD3-дзета человека, в клетки. CAR Т-клетки по изобретению способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к длительной стойкости, что может привести к устойчивому контролю над опухолью.

В вариантах осуществления изобретения дополнительно предложены клетки-хозяева, содержащие любой из рекомбинантных векторов экспрессии, описанных в данном документе. Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к любому типу клеток, которые могут содержать рекомбинантный

экспрессионный вектор. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, растения, животного, водоросли или гриба, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, бактерии или простейшего. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, т. е. выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может представлять собой адгезивную клетку или суспендированную клетку, т. е. клетку, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области техники и включают, например, клетки *E. coli* DH5 α , клетки яичника китайского хомячка, клетки обезьяны, клетки COS, клетки HEK293 и т. п. Для целей амплификации или репликации рекомбинантного вектора экспрессии клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, например, клетку DH5 α . Для получения рекомбинантного CAR, полипептида или белка клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего. Клетка-хозяин может представлять собой человеческую клетку. Хотя клетка-хозяин может относиться к любому типу клеток, может происходить из ткани любого типа и может быть на любой стадии развития, клетка-хозяин может представлять собой лимфоцит периферической крови (PBL). Клетка-хозяин может представлять собой Т-клетку.

Для целей данного изобретения Т-клетка может быть любой Т-клеткой, такой как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка, или Т-клетка из культивируемой линии Т-клеток, например, Jurkat, SupT1 и т. д., или Т-клетка, полученная от млекопитающего. Если Т-клетка получена от млекопитающего, она может быть получена из множества источников, включая, помимо прочего, костный мозг, кровь, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетки также могут быть обогащенными или очищенными. Т-клетка может представлять собой Т-клетку человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку, выделенную из человека. Т-клетка может быть Т-клеткой любого типа и любой стадии развития, включая, помимо прочего, CD4⁺/CD8⁺ двойные положительные Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), CD4⁺ Т-хелперы, например, клетки Th1 и Th2, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), лейкоциты периферической крови (PBL), инфильтрирующие опухоль клетки, Т-клетки памяти, наивные Т-клетки и т. п. Т-клетка может представлять собой CD8⁺ Т-клетку или CD4⁺ Т-клетку.

Также предложена популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток может

представлять собой гетерогенную популяцию, включающую клетку-хозяин, содержащую любой из описанных рекомбинантных векторов экспрессии, в дополнение по меньшей мере к одной другой клетке, например, клетке-хозяину (например, Т-клетке), которая не содержит ни одного из рекомбинантных векторов экспрессии или клетки, отличной от Т-клетки, например, В-клетки, макрофага, эритроцита, нейтрофила, гепатоцита, эндотелиальной клетки, эпителиальной клетки, мышечной клетки, клетки мозга и т. д. Альтернативно, популяция клеток может быть по существу гомогенной популяцией, в которой популяция в основном содержит клетки-хозяева (например, состоящие в основном из), содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор. Популяция также может быть клональной популяцией клеток, в которой все клетки популяции являются клонами одной клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный экспрессионный вектор, так что все клетки популяции содержат рекомбинантный экспрессионный вектор. В одном варианте осуществления популяция клеток представляет собой клональную популяцию, содержащую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор, как описано в данном документе.

Фармацевтические композиции / введение

В вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, экспрессирующие CAR, могут быть представлены в композициях, например, подходящей фармацевтической композиции(-ях), содержащей клетки, экспрессирующие CAR, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество лимфоцитов, экспрессирующих один или более из описанных CAR, и фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать экспрессирующую CAR клетку, например, множество экспрессирующих CAR клеток, как описано в данном документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или разбавителями. Фармацевтически приемлемый носитель может быть ингредиентом фармацевтической композиции, отличным от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта.

Фармацевтически приемлемый носитель может включать, без ограничений, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант. Примерами фармацевтически приемлемых носителей являются растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие

всасывание агенты и т. п., которые обладают физиологической совместимостью, такие как соли, буферы, антиоксиданты, сахараиды, водные или неводные носители, консерванты, смачивающие агенты, поверхностно-активные вещества или эмульгирующие агенты или их комбинации. Количества фармацевтически приемлемого (-ых) носителя (-ей) в фармацевтических композициях могут быть определены экспериментально на основании активностей носителя (-ей) и желаемых характеристик состава, таких как стабильность и/или минимальное окисление.

Такие композиции могут содержать буферные растворы, такие как уксусная кислота, лимонная кислота, муравьиная кислота, янтарная кислота, фосфорная кислота, угольная кислота, яблочная кислота, аспарагиновая кислота, гистидин, борная кислота, трис-буферные растворы, HEPPSO, HEPES, нейтральный буферный раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстран, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); антибактериальные и противогрибковые агенты; и консерванты.

Композиции по настоящему описанию могут быть составлены для различных способов парентерального или непарентерального введения. В одном варианте осуществления композиции могут быть составлены для инфузии или внутривенного введения. Композиции, описанные в данном документе, могут быть обеспечены, например, в виде стерильных жидких препаратов, например изотонических водных растворов, эмульсий, суспензий, дисперсий или вязких композиций, которые могут быть забуферены до желаемого pH. Составы, приемлемые для перорального введения, могут включать жидкие растворы, капсулы, пакеты-саше, таблетки, пастилки для рассасывания и троше, жидкие порошковые суспензии в соответствующих жидкостях и эмульсиях.

Термин «фармацевтически приемлемый», используемый в данном документе в отношении фармацевтических композиций, обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и/или людей.

В одном аспекте изобретение относится к введению генетически модифицированной Т-клетки, экспрессирующей CAR, для лечения субъекта, страдающего раком или подверженного риску заболеть раком, с использованием

инфузии лимфоцитов. По меньшей мере, в одном варианте осуществления в лечении используется инфузия аутологичных лимфоцитов. Аутологичные МКПК собирают у субъекта, нуждающегося в лечении, и Т-клетки активируют и размножают с использованием способов, описанных в данном документе и известных в данной области техники, а затем снова вводят субъекту.

В одном аспекте изобретение относится по существу к лечению субъекта, подверженного риску развития рака. Настоящее изобретение также включает лечение злокачественного образования или аутоиммунного заболевания, при котором химиотерапия и/или иммунотерапия у субъекта приводят к значительной иммуносупрессии, таким образом повышая риск развития рака у субъекта. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы предотвращения рака, причем способы включают введение количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более описанных CAR, нуждающимся в этом субъекту.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения субъекта, имеющего рак, включающие введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более описанных CAR, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего лимфоциты индуцируют или модулируют уничтожение раковых клеток у субъекта.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы уменьшения опухолевой нагрузки у субъекта, страдающего раком, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более CAR, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего лимфоциты индуцируют уничтожение раковых клеток у субъекта. В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы увеличения выживаемости субъекта, страдающего раком, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более описанных CAR, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего выживаемость субъекта увеличивается. Как правило лимфоциты, экспрессирующие CAR, вызывают уничтожение раковых клеток у субъекта и приводят к уменьшению или уничтожению опухолей / раковых клеток у субъекта. Не имеющий ограничительного характера перечень видов рака, включая метастатические поражения, на который можно воздействовать направленно, включает В-клеточную лимфому и ее производные. В одном варианте осуществления рак, подлежащий лечению у субъекта, представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых

вариантах осуществления рак представляет собой неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак гематопоезического происхождения, такой как диффузная В-клеточная крупноклещечная лимфома (DLBCL), мантийноклещечная лимфома (MCL), фолликулярная лимфома (FL), лимфома маргинальной зоны (MZ), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), множественная миелома (MM), лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфома Ходжкина, лимфома Беркитта, волосатоклещечный лейкоз или плазмощитомы.

В одном аспекте предложены способы лечения субъекта, страдающего раком, которые включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих CAR, CAR, имеющего внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает антиген CD79b, нуждающемся в этом субъекте, в результате чего лимфоцит вызывает уничтожение раковых клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164-207. В одном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 164, или последовательность SEQ ID NO: 164. В одном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 165, или последовательность SEQ ID NO: 165. В одном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 166, или последовательность SEQ ID NO: 166. В одном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

последовательности SEQ ID NO: 206, или последовательность SEQ ID NO: 206. В одном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50, по меньшей мере на 55, по меньшей мере на 60, по меньшей мере на 65, по меньшей мере на 70, по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 207, или последовательность SEQ ID NO: 207.

В одном аспекте описан способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом, экспрессирующим один или более из описанных CAR, при этом лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки. Не имеющий ограничительного характера перечень раковых клеток, включающий метастатические раковые клетки, на которые можно воздействовать направленно, включают В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому и их комбинации. В одном варианте осуществления раковая клетка представляет собой злокачественную В-клетку.

Фармацевтические композиции по настоящему описанию можно вводить таким способом, который соответствует заболеванию, подлежащему лечению (или предотвращению). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как патологическое состояние субъекта, а также типом и тяжестью заболевания субъекта, хотя соответствующие дозы могут определяться клиническими испытаниями.

Когда указано терапевтически эффективное количество, точное количество композиций по настоящему описанию для введения может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий по возрасту, весу, размеру опухоли, степени инфекции или метастазирования, а также состояния субъекта. В целом можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая описанные в данном документе Т-клетки, может вводиться в дозах от около 10^4 до около 10^{10} клеток/кг массы тела, в некоторых случаях от около 10^5 до около 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, описанные в данном документе, можно вводить в дозе около 10^6 клеток/кг массы тела. Композиции Т-клеток также могут вводиться несколько раз в этих дозах. Клетки могут вводиться с помощью методов инфузии, которые широко известны в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988).

Системы доставки, полезные в контексте вариантов осуществления изобретения, могут включать системы доставки с замедленным высвобождением, отсроченным высвобождением и пролонгированным высвобождением, так что доставка композиций Т-клеток происходит до и с достаточным временем, чтобы

5 вызвать сенсibilизацию участка, подлежащего лечению. Композицию можно применять в сочетании с другими терапевтическими средствами или видами терапии. Такие системы позволяют избежать повторных введений композиции, тем самым повышая удобство для пациента и врача, и могут быть особенно пригодными для определенных вариантов осуществления композиции согласно данному изобретению.

10 Многие типы высвобождающих систем доставки доступны и известны специалистам в данной области техники. Они включают системы на основе полимеров, таких как поли(лактид-гликолид), сополиоксалаты, поликапролактоны, сложные полиэфирамиды, сложные полиортоэфиры, полигидроксимасляная кислота и полиангидриды. Микрокапсулы указанных выше полимеров, содержащие

15 лекарственные средства, описаны, например, в патенте США № 5,075,109. Системы доставки также включают неполимерные системы, которые представляют собой липиды, включая стерины, такие как холестерин, сложные эфиры холестерина и жирных кислот, или нейтральные жиры, такие как моно-, ди- и триглицериды; силастические системы; системы на основе пептидов; гидрогелевые системы

20 высвобождения; восковые покрытия; прессованные таблетки с применением обычных связывающих веществ и наполнителей; частично сшитые импланты; и т. п. Инструменты включают, без ограничений, следующие: (а) эрозионные системы, в которых агент согласно изобретению содержится в форме внутри матрицы, такие как описаны в патентах США № 4,452,775; 4,667,014; 4,748,034; и 5,239,660 и (б)

25 диффузионные системы, в которых активный компонент высвобождается с контролируемой скоростью из полимера, такие как описаны в патентах США № 3,854,480 и № 3,832,253. Кроме того, можно применять аппаратные системы доставки на основе насоса, некоторые из которых адаптированы для имплантации.

В определенных аспектах может быть необходимым введение активированных

30 Т-клеток субъекту и затем повторное взятие крови (или осуществление афереза), активация Т-клеток в соответствии с данным изобретением и повторная инфузия субъекту этих активированных и размноженных Т-клеток. Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах Т-клетки могут быть активированы во взятой крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В

некоторых аспектах Т-клетки активируют во взятой крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см или 100 куб. см.

Введение CAR-T-клеток и композиций может осуществляться любым способом, например, путем парентерального или непарентерального введения, в том числе
 5 ингаляции аэрозоля, инъекции, инфузии, перорального введения, трансфузии, имплантации или трансплантации. Например, CAR-T-клетки и композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, внутрикочно, подкожно, внутриопухолево, интрамедуллярно, интранодально, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте
 10 композиции по настоящему описанию вводят путем в/в инъекции. В одном аспекте композиции по настоящему описанию вводят субъекту путем внутрикочной или подкожной инъекции. Композиции Т-клеток можно вводить, например, непосредственно в опухоль, лимфатический узел, ткань, орган или место инфекции.

Введение может быть аутологичным или неаутологичным. Например,
 15 иммунореактивные клетки, экспрессирующие CAR, специфичный к кластеру для дифференциации белка 79В (например, CD79b), могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Т-клетки, полученные из периферической крови по настоящему изобретению, или размноженные Т-клетки (например, полученные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*), можно
 20 вводить, например, посредством внутривенной инъекции, локальной инъекции, системной инъекции, катетерного введения или парентерального введения.

В конкретном варианте осуществления субъект может подвергаться лейкоферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или деплецируют *ex vivo*, чтобы отобрать и/или выделить представляющие интерес клетки, например, Т-клетки.
 25 Эти Т-клеточные изоляты могут быть размножены известными в данной области техники способами и обработаны таким образом, что может быть введена одна или более конструкций CAR по настоящему изобретению, и, таким образом, создана CAR-Т-клетка. Нуждающиеся в этом субъекты могут впоследствии подвергаться стандартному лечению высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией
 30 стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после трансплантации или одновременно с ней субъектам выполняют инфузию размноженных CAR-Т-клеток. В одном аспекте размноженные клетки вводят до операции или после нее.

Дозы, вводимой пациенту, имеющему злокачественные новообразования, достаточно для ослабления или по меньшей мере частичной задержки заболевания,

подлежащего лечению («терапевтически эффективное количество»). Дозировка вышеприведенных требующих введения субъекту препаратов будет варьироваться в зависимости от точной природы патологического состояния, подлежащего лечению, и пациента, получающего лечение. Масштабирование доз для введения человеку может
 5 быть выполнено в соответствии с общепринятыми в данной области техники практиками.

Т-клетки CAR по изобретению можно подвергать экспансии *in vivo* и возможно создавать CD79b-специфические клетки памяти, которые сохраняются на высоких уровнях в течение продолжительного времени в крови и костном мозге. В некоторых
 10 случаях клетки CAR Т по настоящему изобретению, введенные субъекту, могут уничтожать раковые клетки, например, злокачественные В-клетки, *in vivo* у субъектов с резистентным к химиотерапии прогрессирующим раком.

В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению вводят в Т-клетки, например, с использованием транскрипции *in vitro*, и субъект (например,
 15 человек) получает начальное введение CAR-Т-клеток по настоящему изобретению и одно или более последующих введений CAR-Т-клеток, при этом одно или более последующих введений проводят менее чем через 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) вводят CAR-Т-клетки более одного раза
 20 в неделю, например, 2, 3 или 4 введения CAR-Т-клеток в неделю. В одном варианте осуществления субъект получает более одного введения CAR-Т-клеток в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (что также называется в данном документе циклом), за которым следует перерыв введения CAR-Т-клеток на одну неделю, а затем одно или более дополнительных введений CAR-Т-клеток (например, более одного
 25 введения CAR-Т-клеток в неделю) субъекту. В еще одном варианте осуществления субъекту выполняют более одного цикла введения CAR-Т-клеток, а период времени между каждым циклом составляет менее чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, или 3 дня. В одном варианте осуществления CAR-Т-клетки вводят через день, 3 введения в неделю. В одном варианте осуществления CAR-Т-клетки по настоящему изобретению вводят в
 30 течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

В одном варианте осуществления введение можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца,

три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Кроме того, возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. При повторном введении можно вводить такую же дозу или другую дозу.

5 CAR-T-клетки можно вводить способами по настоящему изобретению с помощью поддерживающей терапии, такой как, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или более.

10 В одном варианте осуществления CAR-T-клетки генерируются с использованием лентивирусных векторов, таких как лентивирус. CAR-T-клетки, полученные с помощью таких вирусных векторов, как правило, будут иметь стабильную экспрессию CAR.

В одном варианте осуществления CAR-T-клетки транзистентно экспрессируют векторы CAR в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. На транзистентную экспрессию CAR может влиять доставка РНК-вектора CAR. В одном варианте осуществления РНК CAR трансдуцируют в Т-клетку путем электропорации.

15 Если пациент подвержен высокому риску развития ответа в форме выработки антител к CAR в ходе терапии с транзистентной экспрессией CAR (например, полученные путем трансдукции РНК), перерывы в инфузии CAR-T не должны длиться более, чем от десяти до четырнадцати дней.

20 Экспрессирующая CAR клетка, описанная в данном документе, может использоваться в комбинации с другими известными веществами и средствами лечения. Введение «в комбинации», как используется в настоящем документе, означает, что два (или более) различных средства лечения доставляют субъекту в течение курса лечения заболевания, например, два или более средств лечения доставляют после того, как у субъекта диагностировали рак, и перед тем, как рак был
25 вылечен, или устранен, или лечение было прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго средства лечения, таким образом, существует перекрытие с точки зрения введения. Иногда в настоящем документе это называется как «одновременная» или «сопутствующая доставка». В других вариантах
30 осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго средства лечения, или

же второе средство лечения снижает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы в том случае, если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или же аналогичная ситуация наблюдается для первого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что снижение симптома или другого параметра, связанного с заболеванием, является более значительным, чем наблюдалось бы в том случае, если бы одно средство лечения доставляли в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим чем аддитивным. Доставка может осуществляться таким образом, что эффект первого вводимого средства лечения все еще будет определяться во время доставки второго средства.

В одном варианте осуществления другие терапевтические агенты, такие как факторы, можно вводить до, после или одновременно (параллельно с) с CAR-T-клетками, включая, без ограничений, интерлейкины, а также колониестимулирующие факторы, такие как G-, M- и GM-CSF, и интерфероны.

Экспрессирующая CAR клетка, описанная в данном документе, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент могут вводиться одновременно в одной или в отдельных композициях, либо вводиться последовательно. В случае последовательного введения экспрессирующую CAR клетку, описанную в данном документе, можно вводить первой, а дополнительный агент можно вводить вторым, либо же порядок введения может быть обратным.

В дополнительных вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, описанные в настоящем документе, можно использовать в режиме лечения в комбинации с хирургическим вмешательством, лучевой или химиотерапией, иммуносупрессивным агентом, антителами или другими иммуноабляционными агентами. В другом варианте осуществления клетку, экспрессирующую CAR, описанную в настоящем документе, можно использовать в комбинации с антиандрогенным лечением. В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое повышает активность экспрессирующей CAR клетки. Например, в одном варианте осуществления агент может быть таким, который ингибирует ингибирующую молекулу.

Наборы

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему любой из химерных антигенных рецепторов (CAR), описанных в настоящем документе, и/или нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие векторы.

Набор можно применять для терапевтических областей применения и в виде диагностических наборов.

Набор можно применять для обнаружения наличия CD79b или клетки, экспрессирующей CD79b, в образце.

Набор может содержать один или более из других элементов: инструкцию по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, используемый для хелатирования или иного сочетания, антитело для мечения, или терапевтический агент, или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для подготовки антитела к введению; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит любой из указанных выше CAR, нуклеиновых кислот, векторов и/или клеток-хозяев в контейнере и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD79b, который содержит

VH с SEQ ID NO: 1 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 19;

VH с SEQ ID NO: 1 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 20;

VH с SEQ ID NO: 2 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 19;

VH с SEQ ID NO: 2 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 20;

VH с SEQ ID NO: 3 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 20;

VH с SEQ ID NO: 4 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 19;

VH с SEQ ID NO: 5 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 22;

VH с SEQ ID NO: 5 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 23;

VH с SEQ ID NO: 6 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 24;

VH с SEQ ID NO: 7 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 26;

VH с SEQ ID NO: 8 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 25;

VH с SEQ ID NO: 9 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 27;

VH с SEQ ID NO: 10 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 11 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 29;

VH с SEQ ID NO: 12 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 30;
 VH с SEQ ID NO: 13 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 31;
 VH с SEQ ID NO: 14 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 32;
 VH с SEQ ID NO: 15 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 33;
 5 VH с SEQ ID NO: 16 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 34;
 VH с SEQ ID NO: 16 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 35;
 VH с SEQ ID NO: 17 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 33; или
 VH с SEQ ID NO: 18 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит CAR с SEQ ID NO: 75,
 10 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99,
 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 или
 118.

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

15 В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака, экспрессирующего CD79b, у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества любого из выделенных лимфоцитов, экспрессирующих любой из CAR, описанных в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для
 20 лечения рака, экспрессирующего CD79b.

В изобретении также предложен способ лечения рака, экспрессирующего CD79b, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей любые выделенные лимфоциты, экспрессирующие любой из описанных в данном документе CAR, субъекту в течение
 25 времени, достаточного для лечения рака, экспрессирующего CD79b.

В одном аспекте изобретение относится по существу к лечению субъекта, подверженного риску развития рака. Изобретение также включает лечение злокачественного образования или аутоиммунного заболевания, при котором химиотерапия и/или иммунотерапия приводит к значительной иммуносупрессии, тем
 30 самым повышая риск развития рака у субъекта.

В настоящем описании также предложен способ лечения состояния, отличного от ракового, у субъекта с риском развития ракового состояния, включающий введение субъекту любых выделенных лимфоцитов, экспрессирующих любой из CAR, описанных в настоящем документе, для лечения состояния, отличного от ракового.

В описании также предложен способ лечения состояния, отличного от ракового, у субъекта с риском развития ракового состояния, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей CAR, описанный в настоящем документе, субъекту для лечения состояния, отличного от ракового.

5 В изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего CD79b, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего домена, который связывает CD79b по изобретению, в течение времени, достаточного для профилактики рака, экспрессирующего CD79b. Примеры раковых заболеваний, экспрессирующих CD79b, включают без ограничения
10 клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому (DLBCL), мантийноклеточную лимфому (MCL), фолликулярную лимфому (FL), лимфому маргинальной зоны (MZ), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), множественную миелому (MM), лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек
15 (MALT), лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, волосатоклеточный лейкоз и плазмоцитому.

В настоящем изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего CD79b, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который
20 связывает CD79b по изобретению, в течение времени, достаточного для профилактики рака, экспрессирующего CD79b. Примеры рака, экспрессирующего CD79b, включают, без ограничения, В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, лимфому DLBCL, MCL, FL, MZ, ALL, CLL, MM, MALT, лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, волосатоклеточный лейкоз и плазмоцитому.

25 В изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего CD79b, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD79b по изобретению, в течение времени, достаточного для профилактики рака, экспрессирующего CD79b. Примеры рака, экспрессирующего CD79b, включают,
30 без ограничения, В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, лимфому DLBCL, MCL, FL, MZ, ALL, CLL, MM, MALT, лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, волосатоклеточный лейкоз и плазмоцитому.

В настоящем изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего CD79b, у субъекта, включающий введение субъекту

терапевтически эффективного количества любой из клеток CAR-T, описанных в настоящем документе, которые связывают CD79b по настоящему изобретению, в течение времени, достаточного для предупреждения рака, экспрессирующего CD79b. Примеры рака, экспрессирующего CD79b, включают, без ограничения, В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, лимфому DLBCL, MCL, FL, MZ, ALL, CLL, MM, MALT, лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, волосатоклеточный лейкоз и плазмочитому

В настоящем изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего CD79b, у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества любых выделенных лимфоцитов, экспрессирующих любой из CAR, описанных в настоящем документе, в течение времени, достаточного для предотвращения рака, экспрессирующего CD79b. Примеры рака, экспрессирующего CD79b, включают, без ограничения, В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, лимфому DLBCL, MCL, FL, MZ, ALL, CLL, MM, MALT, лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, волосатоклеточный лейкоз и плазмочитому

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий CD79b, представляет собой В-клеточную лимфому.

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий CD79b, представляет собой неходжкинскую лимфому.

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий CD79b, имеет метастазы.

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий CD79b, представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), мантийноклеточную лимфому (MCL), фолликулярную лимфому (FL), лимфому маргинальной зоны (MZ), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), множественную миелому (MM), лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта и плазмочитому.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены способы лечения субъекта, страдающего раком, причем способы включают введение любого из выделенных лимфоцитов, экспрессирующих любой из CAR, описанных в настоящем документе, посредством чего лимфоцит индуцирует или модулирует уничтожение раковых клеток у субъекта.

Любой из выделенных лимфоцитов, экспрессирующих любой из описанных в данном документе CAR, можно использовать в сочетании с другими терапевтическими средствами или способами лечения. Такие системы позволяют избежать повторных введений композиции, тем самым повышая удобство для пациента и врача, и могут
 5 быть особенно пригодными для определенных вариантов осуществления композиции согласно данному изобретению.

Введение любых выделенных лимфоцитов, экспрессирующих любой из CAR, описанных в настоящем документе, можно осуществлять посредством любого способа, например, путем парентерального или непарентерального введения, включая
 10 аэрозольную ингаляцию, инъекцию, инфузию, прием внутрь, переливание, имплантацию или трансплантацию. Например, связывающие CD79 белки и композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, внутривенно, подкожно, внутриопухолево, интрамедуллярно, интранодально, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или
 15 внутрибрюшинно. В одном аспекте композиции по настоящему описанию вводят путем в/в инъекции. В одном аспекте композиции по настоящему описанию вводят субъекту путем внутривенной или подкожной инъекции. Композиции связывающих CD79 белков можно вводить, например, непосредственно в опухоль, лимфатический узел, ткань, орган или место инфекции.

В одном варианте осуществления введение можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Кроме того, возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. При повторном
 20 введении можно вводить такую же дозу или другую дозу.

Комбинированные терапии

Любой из выделенных лимфоцитов, экспрессирующих любой из описанных в данном документе CAR, можно вводить в комбинации по меньшей мере с одним
 30 дополнительным терапевтическим средством.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, андроген-депривационную терапию или облучение, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго средства лечения, таким образом, существует перекрытие с точки зрения введения. Иногда в настоящем документе это называется как «одновременная» или «сопутствующая доставка». В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго средства лечения, или же второе средство лечения снижает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы в том случае, если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или же аналогичная ситуация наблюдается для первого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что снижение симптома или другого параметра, связанного с заболеванием, является более значительным, чем наблюдалось бы в том случае, если бы одно средство лечения доставляли в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим чем аддитивный. Доставка может осуществляться таким образом, что эффект первого вводимого средства лечения все еще будет определяться во время доставки второго средства.

В одном варианте осуществления другие терапевтические средства, такие как факторы, можно вводить до, после или одновременно (совместно) с любым из выделенных лимфоцитов, экспрессирующих любой из CAR, описанных в настоящем документе, включая, без ограничения, интерлейкины, а также колониестимулирующие факторы, такие как G-, M- и GM-CSF, и интерфероны.

Любые из выделенных лимфоцитов, экспрессирующих любой из описанных в данном документе CAR, могут содержать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, которое можно вводить одновременно, в одной или в отдельных композициях, или последовательно. В случае последовательного введения лимфоциты, описанные в данном документе, можно вводить первыми, а дополнительное средство можно вводить вторым, либо же порядок введения может быть обратным.

В дополнительных вариантах осуществления лимфоциты, описанные в настоящем документе, можно использовать в режиме лечения в комбинации с

хирургическим вмешательством, лучевой или химиотерапией, иммуносупрессивным агентом, антителами или другими иммуноабляционными агентами. В другом варианте осуществления лимфоциты, описанные в настоящем документе, можно использовать в комбинации с антиандрогенным лечением. В одном варианте осуществления субъекту могут вводить средство, которое повышает активность лимфоцита. Например, в одном варианте осуществления агент может быть таким, который ингибирует ингибирующую молекулу.

Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из описанных в настоящем документе вариантов осуществления. Примеры призваны проиллюстрировать, но не ограничить описанные варианты осуществления.

Описание иллюстративных вариантов осуществления данного изобретения приведено ниже.

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

(a) внеклеточный домен, который специфически связывается с антигеном CD79b;

(b) трансмембранный домен; и

(c) внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

2. CAE по варианту осуществления 1, дополнительно включающий:

(d) шарнирную область CD8a,

где трансмембранный домен включает полипептид CD8a трансмембранной области (CD8a-TM); и

где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен, содержащий компонент члена 9 суперсемейства TNF-рецепторов (CD137) и первичный сигнальный домен, содержащий компонент дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток.

3. CAR по варианту осуществления 2, в котором

шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 38;

трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 39; и/или

внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 40, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 41.

4. Химерный антигенный рецептор (CAR – англ.: chimeric antigen receptor), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 224;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 238, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 240;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 242, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 243, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 244;

5 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 249, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250;

10 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 253, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 255;

15 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259;

20 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 243, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 269, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 270; или

25 CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 275, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 276;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

30

5. CAR по варианту осуществления 4, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, CDR2 тяжелой цепи,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259.

6. Химерный антигенный рецептор (CAR – англ.: chimeric antigen receptor),
содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и
внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий
домен содержит:

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 211, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 213;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 214, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 213;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 215, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 213;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 219, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 220, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 221;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 225, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 226, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 227;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 230, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 231, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 221;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO: 235, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

7. CAR по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262.

8. CAR по варианту осуществления 4 или варианту осуществления 5, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен дополнительно содержит:

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 225, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 230, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 231, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221;

NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278.

9. CAR по варианту осуществления 8, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262.
10. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208, 216, 222, 228, 232, 238, 242, 248, 253, 257, 263, 268 или 274, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 209, 217, 223, 233, 239, 243, 249, 254, 258, 269 или 275, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 210, 218, 224, 229, 234, 240, 244, 250, 255, 259, 264, 270 или 276, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 211, 214, 215, 219, 225, 230, 235, 241, 245, 251, 260, 265, 271 или 277, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 212, 220, 226, 231, 236, 246, 261, 266 или 272 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 213, 221, 227, 237, 247, 252, 256, 262, 267, 273 или 278.
11. CAR по любому из вариантов осуществления 1-10, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность
 - a) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211, 212 и 213, соответственно;
 - b) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 214, 212 и 213, соответственно;
 - c) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 215, 212 и 213, соответственно;
 - d) SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220 и 221, соответственно;
 - e) SEQ ID NO: 222, 223, 224, 225, 226 и 227, соответственно;
 - f) SEQ ID NO: 228, 217, 229, 230, 231 и 221, соответственно;

- g) SEQ ID NO: 232, 233, 234, 235, 236 и 237, соответственно;
- h) SEQ ID NO: 238, 239, 240, 241, 226 и 227, соответственно;
- i) SEQ ID NO: 242, 243, 244, 245, 246 и 247, соответственно;
- j) SEQ ID NO: 248, 249, 250, 251, 236 и 252, соответственно;
- 5 k) SEQ ID NO: 253, 254, 255, 251, 236 и 256, соответственно;
- l) SEQ ID NO: 257, 258, 259, 260, 261 и 262, соответственно;
- m) SEQ ID NO: 263, 243, 264, 265, 266 и 267, соответственно;
- n) SEQ ID NO: 268, 269, 270, 271, 272 и 273, соответственно; или
- o) SEQ ID NO: 274, 275, 276, 277, 266 и 278, соответственно.

10

12. CAR по любому из вариантов осуществления 1-11, отличающийся тем, что
внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2
тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3
легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, 258,
15 259, 260, 261 и 262, соответственно.

15

13. Химерный антигенный рецептор (CAR – англ.: chimeric antigen receptor),
содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и
внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий
20 домен содержит:

20

вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную
последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична последовательности,
выбранной из SEQ ID NO: 1-18; и/или

вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную
25 последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична последовательности,
выбранной из SEQ ID NO: 19-36;

25

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

14. CAR по варианту осуществления 13, в котором внеклеточный
30 антигенсвязывающий домен содержит:

30

вариабельный домен (VH) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную
последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-18; и/или

вариабельный домен (VL) легкой цепи, содержащий аминокислотную
последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19-36;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

15. CAR по варианту осуществления 13, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 19;

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 20;

15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 19;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 20;

25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 20;

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 4, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 19;

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 22;

 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 5, и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 32;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 33;

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 34;

15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 35;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 33; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 36.

25 16. CAR по любому из вариантов осуществления 13-15, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, 15 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; или

25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

17. CAR по варианту осуществления 13 или 15, в котором внеклеточный 30 антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 32.

18. CAR по любому из вариантов осуществления 13-17, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

19. CAR по любому из вариантов осуществления 1-18, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), scFv содержит вариабельную область легкой цепи (VH) и вариабельную область тяжелой цепи (VL).

20. CAR по варианту осуществления 19, в котором scFv содержит линкерный полипептид между вариабельной областью тяжелой цепи (VH) и вариабельной областью легкой цепи (VL).

21. CAR по варианту осуществления 20, отличающийся тем, что линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность, меньшей мере на 90 % идентичную SEQ ID NO: 42.

22. CAR по варианту осуществления 20 или 21, в котором линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

23. CAR по любому из вариантов осуществления 19-22, отличающийся тем, что scFv содержит аминокислотную последовательность, меньшей мере на 90 % идентичную последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 75-118.

24. CAR по любому из вариантов осуществления 19-23, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75-118.

25. CAR по любому из вариантов осуществления 19-23, отличающийся тем, что scFv содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 113.
- 5 26. CAR по любому из вариантов осуществления 19-25, отличающийся тем, что scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113.
27. CAR по любому из вариантов осуществления 1-26, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит сигнальный полипептид.
- 10 28. CAR по варианту осуществления 27, отличающийся тем, что сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность, меньшей мере на 90 % идентичную SEQ ID NO: 37.
- 15 29. CAR по варианту осуществления 27 или 28, в котором сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.
30. CAR по любому из вариантов осуществления 4-29, в котором внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента члена суперсемейства дифференцировки и их комбинации.
- 20 31. CAR по варианту осуществления 30, отличающийся тем, что компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность, меньшей мере на 90 % идентичную SEQ ID NO: 40.
- 25 32. CAR по варианту осуществления 30 или 31, в котором компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.
- 30 33. CAR по любому из вариантов осуществления 30-32, отличающийся тем, что компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 41.

34. CAR по любому из вариантов осуществления 30-33, в котором компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41

5 35. CAR по любому из вариантов осуществления 30-34, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 163.

10 36. CAR по любому из вариантов осуществления 30-35, причем внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163.

37. CAR по любому из вариантов осуществления 4-36, в котором трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM).

15 38. CAR по варианту осуществления 37, отличающийся тем, что полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность, меньшей мере на 90 % идентичную SEQ ID NO: 39.

20 39. CAR по варианту осуществления 37 или 38, в котором полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

25 40. CAR по любому из вариантов осуществления 4-39, дополнительно содержащий шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

41. CAR по варианту осуществления 40, в котором шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8a.

30 42. CAR по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, меньшей мере на 90 % идентичную SEQ ID NO: 38.

43. CAR по варианту осуществления 41 или 42, в котором шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

44. CAR по любому из вариантов осуществления 1-43, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-162, или последовательности, на 90% идентичной ей.

45. CAR по любому из вариантов осуществления 1-44, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 157.

46. CAR по любому из вариантов осуществления 1-45, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

47. CAR по любому из вариантов осуществления 1-46, в котором CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164-207, или последовательности, на 90% идентичной ей.

48. CAR по любому из вариантов осуществления 1-47, отличающийся тем, что CAR содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 202.

49. CAR по любому из вариантов осуществления 1-48, отличающийся тем, что CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202.

50. Выделенный лимфоцит, экспрессирующий CAR по любому из вариантов осуществления 1-49.

51. Выделенный лимфоцит по варианту осуществления 50, в котором лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит.

52. Выделенный лимфоцит по варианту осуществления 51, причем Т-лимфоцит представляет собой натуральную клетку-киллер (NK).

53. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по любому из вариантов осуществления 1-49.
54. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 53.
55. Клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 53.
56. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество лимфоцитов по любому из вариантов осуществления 50–52 и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.
57. Способ лечения субъекта, имеющего рак, причем указанный способ включает:
введение субъекту терапевтически эффективного количества лимфоцита по любому из вариантов осуществления 50-52 или фармацевтической композиции по варианту осуществления 56, при этом лимфоцит индуцирует уничтожение раковых клеток у субъекта.
58. Способ по варианту осуществления 57, отличающийся тем, что рак представляет собой В-клеточную лимфому.
59. Способ по варианту осуществления 57 или варианту осуществления 58, отличающийся тем, что рак представляет собой неходжкинскую лимфому.
60. Способ по любому из вариантов осуществления 57–59, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), мантийноклеточную лимфому (MCL), фолликулярную лимфому (FL), лимфому маргинальной зоны (MZ), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), множественную миелому (MM), лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, волосатоклеточный лейкоз или плазмоцитому.
61. Способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий:

приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом по любому из вариантов осуществления 50-52, в котором лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки.

62. Способ по варианту осуществления 61, отличающийся тем, что раковая клетка представляет собой злокачественную В-клетку.

63. Способ по варианту осуществления 61 или варианту осуществления 62, отличающийся тем, что раковая клетка представляет собой клетку неходжкинской лимфомы.

64. Способ по любому из вариантов осуществления 61–63, отличающийся тем, что указанный раковая клетка представляет собой клетку диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), фолликулярной лимфомы (FL), лимфомы маргинальной зоны (MZ), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), множественной миеломы (MM), лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфомы Ходжкина, лимфомы Беркитта, волосатоклеточного лейкоза или плазмочитомы.

65. Способ обнаружения наличия рака у субъекта, включающий:

приведение образца клеток, полученного от субъекта, в контакт с CAR по вариантам осуществления 1–49, тем самым формируя комплекс CAR-клетка, и

обнаружение комплекса, причем обнаружение комплекса указывает на наличие рака у субъекта.

ПРИМЕРЫ

Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из описанных в настоящем документе вариантов осуществления. Примеры призваны проиллюстрировать, но не ограничить описанные варианты осуществления.

Пример 1. Конструкция и лентивирусная трансдукция CAR CD79b

Специфические CAR CD79b конструировали, как показано на **фиг. 1**. gBlock (IDT), кодирующие последовательность scFv, клонировали посредством InFusion

(ClonTech) в самоинактивирующийся лентивирусный векторный каркас третьего поколения с промотором EF1a и шарнирным/трансмембранным доменом CD8a с последующим рядом внутриклеточных доменов 4-1BB (CD137) и CD3z. клетки CAR-T получали следующим образом. Первичные Т-клетки человека выделяли с помощью отрицательной селекции с использованием набора для выделения клеток Pan-T (StemCell Technologies Inc.). 1×10^6 клеток стимулировали в соответствии с инструкциями производителя с использованием либо TransAct (Miltenyi) в среде TexMACS, дополненной 100 Ед./мл рекомбинантного IL-2 человека (фиг. 2А–2С, 2G–2I), или с использованием гранул, покрытых антителами к Cd3/CD28 (Dynabeads, Invitrogen) в среде Optimizer, с добавлением 100 Ед./мл IL-2 (Miltenyi) (фиг. 2D–2F). Клетки трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими конструкцию CAR через 24 часа после стимуляции. Из клеток удаляли гранулы и клетки переносили в Grex (Wilson Wolf) в день 5 культивирования. Т-клетки культивировали в течение 12–14 дней перед сбором и замораживанием в среде Cryostor CS10. Во время культивирования среду и цитокин обновляли каждые 2–4 дня. Экспрессию CAR CD79b количественно определяли посредством проточной цитометрии с использованием рекомбинантного внеклеточного домена CD79b человека, слитого с белком AF647. Частота клеток CAR⁺ показана на фиг. 2А–2I.

Пример 2. Лизис опухоли, опосредованное клетками CAR-T CD79b

Замороженные клетки CAR-T размораживали либо в среду TextMACS, либо Optimizer и хранили в течение ночи с 100 Ед./мл рекомбинантного IL-2 человека (Miltenyi). Совместное культивирование осуществляли посредством инкубации клеток CAR-T aCD79b с указанными линиями клеток-мишеней с указанным отношением эффектор:мишень (Е:Т) (на основе частоты CAR⁺) в течение 16–20 часов. Совместные культуры ставили в трех повторностях. Для фиг. 3А на опухолевые клетки наносили метки 10 мкМ CellTraceViolet (CTV) до совместного культивирования. Опухолевые клетки окрашивали с использованием фиксирующего красителя для определения жизнеспособности клеток LIVE/DEAD в ближней ИК-области (Thermo), в течение 30 минут при 4°C, и общее количество жизнеспособных опухолевых клеток количественно определяли посредством проточной цитометрии. Для примера на фиг. 3В–3F, планшеты центрифугировали при 400 г в течение 4 мин через 16–20 часов после постановки, и отбирали супернатант, составлявший ½ объема культуры. Один объем субстрата люциферазы Promega BrightGlo добавляли в соответствии с инструкциями

производителя, и количественно измеряли люминесценцию с использованием Perkin Elmer Envision. В каждом случае % лизиса (или % уничтожения) рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ лизиса} = [1 - (\text{Сигнал в исследуемой лунке} / \text{сигнал в лунке только с опухоли})] * 100$$

Результаты представлены на **фиг. 3А-3F**. Показан средний % лизиса $\pm$ стандартное отклонение.

Пример 3. Индуцированное антигеном продуцирование цитокинов клетками

CAR-T CD79b

Продуцирование цитокинов под действием CAR, в частности IL-2, может способствовать устойчивости клеток CAR-T и, в конечном итоге, антиопухолевой функции. Для количественного определения продуцирования цитокинов клетками CAR-T CD79b супернатанты, полученные, как показано на **фиг. 3В-3F**, анализировали с использованием V-Plex MSD 4-plex (IFN γ , IL-2, TNF α , IL-10) (Meso Scale Diagnostics) согласно протоколу производителя. Клетки CAR-T aCD79b продемонстрировали антигензависимое продуцирование цитокинов. Результаты показаны на **фиг. 4А-4D**. Показана средняя концентрация цитокинов $\pm$ стандартное отклонение (пг/мл).

Пример 4. Создание и определение характеристик термически стабилизированных конструкторов scFv CAR

Клон SN8 антитела к CD79b идентифицировали с использованием Astsaturated et al [9]. Гуманизация полученного мышинового клона SN8 была выполнена способом, описанным у Singh et al., MAbs. 2015;7(4):778-91. Гуманизацию проводили в форме scFv, и супернатанты после экспрессии в *E. coli* гуманизированных вариантов инкубировали при 60°C в течение 15 минут с последующим скринингом посредством связывания с рекомбинантным CD79b с использованием ELISA.

Описание и SEQ ID NO иллюстративных конструкций CAR, содержащих термостабилизированные scFv SN8, представлены в **таблице 2**.

Таблица 2. Конструкторы CAR с термически стабилизированными SN8 scFv

№ конструкторов	Описание	SEQ ID NO
1	CD9W23-LH	75
2	CD9W24-LH	76
3	CD9W32-LH	77
4	CD9W33-LH	78

№ конструкторов	Описание	SEQ ID NO
5	CD9W51-LH	79
6	CD9W59-LH	80
7	CD9W83-LH	81
8	CD9W88-LH	82
9	CD9W23-HL	97
10	CD9W24-HL	98
11	CD9W32-HL	99
12	CD9W33-HL	100
13	CD9W51-HL	101
14	CD9W59-HL	102
15	CD9W83-HL	103
16	CD9W88-HL	104

Пример 5. Антиген-зависимая пролиферация CAR CD79b

Клетки CAR-T aCD79b метили 1 мкМ CellTraceViolet (CTV) в концентрации 1×10^6 клеток/мл в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen). Меченые клетки CAR-T совместно культивировали с указанными мишенями в отношении Е:Т 1:2 в течение 4–5 дней. Отношение Е:Т рассчитывали на основе CAR+, и общее количество Т-клеток нормализовали по конструкциям посредством добавления нетрансдуцированных Т-клеток. На день 4–5 клетки собирали и окрашивали реагентом для обнаружения CAR (рекомбинантного CD79b-AF647) и фиксирующим красителем LIVE/DEAD (Invitrogen). Затем проводили анализ пролиферации клеток CAR посредством проточной цитометрии. На **фиг. 5А-5С** графики показывают разведение CTV клеток CAR+. Клетки CAR-T aCD79b демонстрировали разведение CTV особенно при стимуляции линий опухолей CD79b+, а не против антигенных отрицательных линий, что указывает на антиген-зависимую пролиферацию.

Пример 6. Специфический лизис опухолей CD79b в анализе с увеличенной цитотоксичностью

Клетки CAR-T aCD79B совместно культивировали в течение 4–7 дней с указанными линиями клеток-мишеней, экспрессирующих красный флуоресцентный белок (RFP), и с указанным отношением эффектор:мишень (Е:Т) (на основе частоты CAR+). После пролиферации клеток проводили визуализацию каждой лунки каждые 4 часа и расчета общей площади RFP+ на лунку с использованием технологии IncuCyte. Ингибирование роста рассчитывали для каждой из испытанных конструкций (**фиг. 6**).

Пример 7. Противоопухолевая активность CAR CD79b в модели с ксенотрансплантатами CARNAVAL

Клетки CARNAVAL поддерживали в RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). 5×10^5 клеток CARNAVAL в фазе логарифмического роста имплантировали подкожно мышам NOD/scid/IL-2Rg^{-/-} (NSG) в день 0. Клетки CAR-T (клон 23 huSN8 или эталонный CAR CD19 4-1BBz) получали, как описано ранее (пример 1).

Когда средний объем опухоли группы достигал около 50–100 мм³/мышь через около 14 дней после имплантации, указанные дозы клеток CAR-T вводили внутривенно (**фиг. 7А**); нетрансдуцированные клетки CAR-T добавляли для нормализации количества как CAR, так и общих Т-клеток, вводимых для каждого CAR. Объем опухоли измеряли дважды в неделю посредством штангенциркуля (**фиг. 7В**), вместе с массой тела (**фиг. 7С**). CAR клона 23 huSN8 (CD9W23-LH) опосредовали полную регрессию опухоли в дозе 5×10^6 клеток CAR+, без сопутствующей потери массы тела.

Пример 8. Биофизическая характеристика рекомбинантного белка scFv-Fc

Различные образованные scFv сливали с Fc с получением рекомбинантных белков scFv-Fc. Определяли биофизические свойства рекомбинантных белков scFv-Fc, и результаты представлены ниже в таблице 3. Чистоту рекомбинантных белков scFv-Fc измеряли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии.

Исследования связывания слитых белков scFv-Fc с CD79b человека посредством поверхностного плазмонного резонанса

Аффинность связывания слитых белков scFv-Fc с рекомбинантным человеческим CD79b изомформы-1 (длинным) и изоформы-2 (коротким) определяли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора Biacore 8 k. Молекулы scFv-Fc захватывали на поверхности кристалла C1 с использованием антитела к Fc IgG человека с плотностью 30-60 единиц ответа (RU). Затем рекомбинантный антиген CD79b человека вводили по поверхности чипа в концентрациях от 3,70-300 нМ в 3-кратных разведениях с временем связывания 3 минуты и временем диссоциации 30 минут. Исходные сенсограммы связывания приводили к нужной форме путем вычитания сигналов связывания аналита на пустой поверхности, а обработанные сенсограммы анализировали с использованием модели

связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore Insight для получения кинетики связывания и аффинности.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSF)

Термостабильность образцов рекомбинантного слитого белка scFv-Fc определяли посредством нано-дифференциальной сканирующей флуориметрии (NanoDSF) с использованием автоматического прибора Prometeus. Измерения проводили путем загрузки образцов в 24-капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для образцов. Для каждого образца выполняли повторные измерения. Пользовательский интерфейс Prometeus NanoDSF (вкладка Melting Scan) использовали для настройки экспериментальных параметров анализа. Термическое сканирование типичного образца IgG охватывает диапазон от 20°C до 95°C при скорости, составляющей 1°C/минута. Технология Dual-UV позволяет контролировать флуоресценцию интактного триптофана и тирозина при длинах волн излучения 330 нм и 350 нм, и данное отношение ($F_{350 \text{ нм}}/F_{330 \text{ нм}}$) наносят на график зависимости от температуры для создания кривой разворачивания белка. Используя технологию обратного отражения, прибор измерял температуру агрегатов при заданной температуре, которую наносили на график как mAU (единицы измерения толщины) от температуры. NanoDSF использовали для измерения параметров тепловых разворачивающих параметров (T_m и T_{agg}) образцов scFv-Fc при концентрации 0,5 мг/мл в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS), pH 7,4.

Самосвязывание слитых белков scFv-Fc посредством спектроскопии самовзаимодействия наночастиц

Спектроскопию на основе аффинности захвата самовзаимодействия наночастиц (AC-SINS) применяли для измерения склонности кандидатов scFv-Fc к самовзаимодействию. Процент самовзаимодействия потенциально является прогностическим маркером экспрессии и стабильности CAR-T на поверхности клетки. В этом анализе наночастицы золота (AuNP) покрывают иммобилизованным козьим антителом к человеческому IgG (H+L) и затем инкубируют с scFv-Fc-кандидатом в присутствии поликлональных козьих IgG. Любое scFv-Fc-кандидат, вступающее в самостоятельное связывание, в свою очередь привлекает AuNP в непосредственную близость, вызывая сдвиг длины волны наночастиц (λ_p), также называемую длиной волны при максимальной поглощении (λ_{max}). Величина смещения ($\Delta\lambda_{max}$) для каждого scFv-Fc-кандидата указывает на прочность его самостоятельного связывания.

Неспецифическая оценка связывания посредством поверхностного плазмонного резонанса

Неспецифическое связывание антител с неродственными заряженными белками и поликлональными IgG определяли посредством технологии биосенсора. scFv-Fc пропускали по поверхностям поверхностного плазмонного резонанса (SPR), покрытым неродственными белками (например, препаратом из ингибитора Soybean Trypsin, лизоцима, бета-дефензина, объединенного IgG человека, интегрином $\alpha 4\beta 7$, pLBL2) Если антитело проявляет значительное неспецифическое связывание с данными поверхностями, вероятно, что данное связывание приводит к плохой фармакокинетике (PK) и биораспределению, а также субоптимальной экспрессии scFv на поверхности клеток CAR-T. Описание биофизических характеристик рекомбинантных слитых белков scFv-Fc представлено в **таблице 3**.

Таблица 3. Биофизическая характеристика рекомбинантного белка scFv-Fc

Название	Чистота (% мономера)	Аффинность связывания с CD79b (K_D)	T_m (термическая стабильность) ($^{\circ}\text{C}$)	Самосвязывание (AC-SINS)	Неспецифическое связывание (SPR)
CD9B137 LH	93,7	Длинный: 0,6 нМ Короткий 2,1 нМ	59,3	Нет	<25 RU
CD9B137 HL	95,8	Длинный: 0,6 нМ Короткий 2,4 нМ	61,7	Нет	<25 RU
CD9B119 LH	93,8	Длинный: 1,6 нМ Короткий 9,7 нМ	54,1	Нет	<25 RU
CD9B119 HL	93,7	Длинный: 2,2 нМ Короткий 9,4 нМ	55,7	Нет	<25 RU
CD9B337 LH	95,7	Длинный: Двухфазный Короткий 27 нМ	62,4	Нет	<25 RU
CD9B337 HL	94,4	Длинный: Двухфазный Короткий 22 нМ	60,0	Нет	<25 RU
CD9W23 LH	96,6	Длинный: Двухфазный Короткий 11,5 нМ	61,1	Нет	<25 RU
CD9W59 LH	96,4	Длинный: Двухфазный Короткий 6,9 нМ	59,6	Нет	<25 RU
CD9B423 HL	> 90	Длинный: 0,53 нМ Короткий Слабый/отсутствует	62,1	Нет	<25 RU
CD9B430 HL	89,44	Длинный: Двухфазный Короткий Слабый/отсутствует	70,9	Нет	<25 RU
CD9B433 HL	93,41	Длинный: Двухфазный Короткий Слабый/отсутствует	71,1	Нет	<25 RU
CD9B436	> 90	Длинный: 0,54 нМ	60,9	Нет	<25 RU

Название	Чистота (% мономера)	Аффинность связывания с CD79b (K_D)	T_m (термическая стабильность) (°C)	Самосвязывание (AC-SINS)	Неспецифическое связывание (SPR)
HL		Короткий Слабый/отсутствует			
CD9B441 HL	94,99	Длинный: 3,9 нМ Короткий 18,2 нМ	55,4	Нет	<25 RU
CD9B449 HL	94,04	Длинный: 1,52 нМ Короткий Слабый/отсутствует	57,8	Нет	<25 RU
CD9B475 HL	92,60	Длинный: 0,04 нМ Короткий Слабый/отсутствует	56,1	Нет	<25 RU
CD9B480 HL	89,13	Длинный 0,28 нМ Короткий Слабый/отсутствует	51,3	Нет	<25 RU

Пример 9. Получение базального цитокина в отсутствие антигена

В отсутствие антигена секреция базальных цитокинов может указывать на потенциальную тоновую передачу сигналов CAR. Для скрининга данного свойства клетки CAR-T, полученные как описано ранее, размораживали и хранили в течение ночи в полной среде (37°C, 5% CO₂). Через день клетки подсчитывали, высевали в трех повторностях при плотности 50000 клеток CAR на лунку и инкубировали в течение ночи в отсутствие антигена. Общее количество Т-клеток на лунку нормализовали по условиям посредством добавления нетрансдуцированных клеток. Супернатанты культуры собирали после культивирования в течение ночи, и цитокины определяли количественно с использованием Meso Scale Discovery (MSD; набора V Plex Proinflammation Panel 1 [для человека]) в соответствии с инструкциями производителя. Данные анализировали с помощью программы MSD Workstrial, и результаты для каждого донора наносили на график как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (два независимых эксперимента, три технические повторности) с использованием GraphPad Prism. Результаты показаны на **фиг. 8А-8С**. Признаки повышенной экспрессии базального цитокина в культурах, трансдуцированных CAR, в отсутствие антигена или цитокиновой стимуляции отсутствовали, что согласуется с отсутствием тоновой передачи сигналов.

Пример 10. Пролиферация в отсутствие антигена

Тоновая передача сигнала из CAR может приводить к образованию базальной пролиферации в отсутствие антигена. С данной целью клетки CAR-T 441-HL подвергали скринингу на базальную пролиферацию посредством выполнения

пятидневного анализа пролиферации. Клетки CAR-T-размораживали и хранили в течение ночи в полной среде (37°C, 5% CO₂). Через день клетки подсчитывали и процентные доли CAR⁺ нормализовали для каждого донора посредством добавления нетрансдуцированных клеток. Клетки метили красителем Cell Trace™ Violet (CTV) в концентрации 5 мМ в соответствии с инструкциями производителя. После мечения клетки CAR-T разводили до концентрации 5×10⁵ жизнеспособных клеток CAR⁺-T на мл. Клетки вносили в 96-луночный круглодонный планшет (100 мкл на лунку) и выращивали в отсутствие клеток-мишеней и стимуляции цитокинов. В качестве контроля целевые положительные клетки (CARNAVAL) и целевые отрицательные клетки (K562) собирали, подсчитывали и разводили до концентрации 5×10⁵ жизнеспособных клеток на мл в полной среде и добавляли в соответствующие лунки (100 мкл на лунку) с получением отношения CAR⁺ эффектор:мишень (E:T) 1:1. Планшеты инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение пяти дней. В день 5 клетки анализировали посредством проточной цитометрии, гейтинга на CD3⁺ и затем CAR. Разведение CTV красителя (канал Pacific Blue) и маркер экспрессии CD71 использовали для определения процента пролиферирующего вещества (фиг. 9А) и активировали (фиг. 9В) клетки CAR-T, соответственно. У пяти доноров отсутствовали признаки aberrантной пролиферации или активации посредством 441-HL CAR-T в отсутствие антигена или стимуляции цитокинов.

Пример 11. Цитотоксичность на основе проточной цитометрии

Влияние клеток CAR-T 441-HL испытывали на панели из пяти клеточных линий CD79b/CD19⁺ (HBL-1, OCI-LY-10, CARNAVAL, WILL-2 и JEKO-1) и пяти клеточных линий CD79b/CD19[–] (K562, HLY-1, SU-DHL-1, HL-60 и JURKAT E6.1) с использованием анализа на основе проточной цитометрии. Клетки K562, сконструированные для экспрессии CD79b, были включены в панель в качестве дополнительного контроля антигенспецифического уничтожения.

Клетки CAR-T 441-HL, CAR-T cD19 или UTD размораживали и хранили в течение ночи в полной среде (37°C, 5% CO₂). На следующий день клетки подсчитывали и процент клеток CAR нормализовали по донору посредством добавления нетрансдуцированных клеток. Клетки CAR-T повторно суспендировали в концентрации 5×10⁵ клеток CAR⁺ на мл для исходного отношения CAR⁺ эффектор:мишень (E:T) 2,5:1 (2,5×10⁴ клеток CAR⁺ в наибольшем разведении). Всего готовили восемь двукратных разведений (отношение 2,5:1, 2,5×10⁴ клеток CAR⁺);

отношение 1,25:1, $1,25 \times 10^4$ клеток CAR+, отношение 1:1,6, $6,25 \times 10^3$ клеток CAR+; отношение 1:3,2, $3,13 \times 10^3$ клеток CAR+; отношение 1:6,4, $1,56 \times 10^3$ клеток CAR+; отношение 1:13, $7,81 \times 10^2$ клеток CAR+, отношение 1:26, $3,91 \times 10^2$ клеток CAR+, и отношение 1:51, $1,95 \times 10^2$ клеток CAR+, и 100 мкл эффекторных клеток высевали в 96-луночные круглодонные планшеты в соответствии с схемой планшета.

Затем линии клеток-мишеней собирали, подсчитывали и повторно суспендировали в концентрации 4 миллионов клеток/мл в фосфатно-буферном солевом растворе Дульбекко (DPBS). Опухолевые мишени метили с помощью Cell Trace™ Violet (CTV) в концентрации 1 mM в соответствии с инструкциями производителя. Маркированные клетки-мишени разбавляли до концентрации 2×10^5 жизнеспособных клеток на мл в полной среде и 100 мкл меченых клеток добавляли в 96-луночные планшеты (2×10^4 жизнеспособных клеток на лунку), содержащие клетки CAR-T. Планшеты инкубировали при 37 °C 5% CO₂ в течение приблизительно 24 часов.

Через 24 часа клетки окрашивали с использованием фиксирующего красителя для определения жизнеспособности клеток eFluor™ 660 (Thermo Fisher Scientific, 65-0864-14) в соответствии с инструкциями производителя. Опухолевые клетки оценивали посредством проточной цитометрии путем гейтинга с использованием прямого рассеяния и бокового рассеяния для идентификации популяций клеток; затем с окрашиванием красителем LIVE/DEAD для идентификации жизнеспособных клеток; и, наконец, на событиях опухолей CTV+ для оценки количества жизнеспособных раковых клеток в каждой лунке. Процент уничтожения раковых клеток рассчитывали с использованием приведенной ниже формулы (на основании абсолютных значений):

$$\left(\frac{\text{абс. число жизнеспос. раковых клеток при каждом соотн. } E:T}{\text{сред. абс. число жизнеспос. раковых клеток при } 0:1 E:T} \right) \times 100$$

Данные наносили на график как средний % уничтожения +/- стандартная ошибка среднего (3 отдельных эксперимента) для каждого отношения CAR+ E:T. Объединенные графики для пяти доноров (**фиг. 10A-10C** для клеток CD79b/CD19+ и **фиг. 10D-10F** для клеток CD79b/CD19-), а также графики, демонстрирующие отдельную кривую уничтожения для каждого донора (**фиг. 10G-10L** для клеток CD79b/CD19+ и **фиг. 10M-10R** для клеток CD79b/CD19-). В присутствии линий клеток-мишеней CD79b/CD19+ для всех испытанных доноров достигалось антигенспецифическое уничтожение раковых клеток. Какого-либо специфического

уничтожения в присутствии любой из линий отрицательных клеток-мишеней не наблюдалось.

Пример 12. Цитотоксичность на основе IncuCyte®

Кинетику уничтожения CAR-T 441-HL оценивали на панели из двух клеточных
 5 линий CD79b/CD19+ (HBL-1, OCI-LY-10) и двух клеточных линий CD79b/CD19–, экспрессирующих mKATE2 (HLY-1, SU-DHL-1) с использованием технологии IncuCyte®.

Клетки CAR-T 441-HL, CAR-T CD19 или UTD размораживали и хранили в течение ночи в полной среде (37°C, 5% CO₂). На следующий день клетки
 10 подсчитывали и процент клеток CAR нормализовали по донору посредством добавления нетрансдуцированных клеток. Нормализованные клетки CAR-T повторно суспендировали в концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток CAR+ на мл в среде без фенолового красного для исходного отношения CAR+ Е:Т 2,5:1. Всего готовили восемь двукратных разведений (отношение 2,5:1, $2,5 \times 10^5$ клеток CAR+); отношение 1,25:1,
 15 $1,25 \times 10^5$ клеток CAR+, отношение 1:1,6, $6,25 \times 10^4$ клеток CAR+; отношение 1:3,2, $3,13 \times 10^4$ клеток CAR+; отношение 1:6,4, $1,56 \times 10^4$ клеток CAR+; отношение 1:13, $7,81 \times 10^3$ клеток CAR+, отношение 1:26, $3,91 \times 10^3$ клеток CAR+, и отношение 1:51, $1,95 \times 10^3$ клеток CAR+), и эффекторные клетки высевали в 96-луночный планшет в соответствии с схемой планшета (100 мкл на лунку).

20 Затем линии клеток-мишеней собирали, подсчитывали, повторно суспендировали в концентрации 1×10^5 клеток на мл в среде, не содержащей фенолового красного, и высевали в соответствии со схемой планшета (100 мкл на лунку).

После смешивания клеток-мишеней и клеток CAR-T в двух повторностях 80
 25 мкл из каждой лунки переносили в 384-луночный планшет. После высевания совместные культуры помещали в систему визуализации в реальном времени IncuCyte® ZOOM, а изображения автоматически получали как в фазе, так и в флуоресцентных каналах каждые четыре часа в течение 4–6 дней с использованием объектива 4-кратным увеличением (одно изображение). Программное обеспечение IncuCyte® ZOOM использовали для обнаружения клеток-мишеней на основе
 30 экспрессии красного флуоресцентного белка mKATE2 с использованием оптимизированных параметров определения процесса. Для измерения уровня клеток-мишеней на лунку определяли общую красную площадь, а исходные значения

экспортировали в Excel. Для количественного определения уничтожения раковых клеток с течением времени средние значения каждой репликации экспортировали в GraphPad Prism, и значения площади под кривой (AUC), полученные для каждого условия. После нормализации данных до необработанного контроля (мишени
 5 отдельно) отношения Е:Т наносили на график по значениям AUC в качестве дозозависимого ответа. Строили графики как для объединенных (среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего), так и для отдельных значений для пяти доноров (два независимых эксперимента). Объединенные результаты показаны на **фиг. 11А** для клеток CD79b/CD19+ и на **фиг. 11В** для клеток CD79b/CD19-. Графики,
 10 показывающие отдельную кривую уничтожения для каждого донора, продемонстрированы на **фиг. 11С-11D** для клеток CD79b/CD19+ и на **фиг. 11Е-11F** для клеток CD79b/CD19-.

Специфическое уничтожение было обнаружено в присутствии антигенположительных клеточных линий, в то время как в антигенотрицательных
 15 моделях уничтожения не наблюдалось.

Пример 13. Анализ высвобождения цитокинов

Для оценки уровней высвобождения цитокинов при уничтожении клеток CAR-T супернатанты из четырех клеточных линий CD79b/CD19+ (HBL-1, OCI-LY-10, CARNAVAL, WILL-2) и двух клеточных линий CD79b/CD19- (HLY-1 и SU-D-1)
 20 собирали во время анализа на основе проточной цитометрии, описанного выше, и исследовали с использованием Meso Scale Discovery (MSD). Супернатанты размораживали и анализировали в соответствии с инструкциями производителя с использованием планшета MSD (набор V Plex Proinflammation Panel 1 [для человека]). Анализ данных проводили с использованием программы MSD Discovery Workbench, и
 25 результаты для каждого цитокина наносили на график как отдельные значения для пяти доноров (два независимых эксперимента; N = 10 общих значений на группу лечения) с использованием GraphPad Prism. Средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего, рассчитанные и нанесенные на график для каждой из групп лечения. Результаты показаны на **фиг. 12А-12J**.

30 Посредством анализа MSD выявляли антигенспецифическую продукцию провоспалительных цитокинов клетками CAR-T 441-HL. Какой-либо индукции высвобождения цитокинов по сравнению с UTD не наблюдалось в присутствии испытанных антиген-отрицательных клеточных линий.

Пример 14. Эффективность *in vivo* клеток CAR-T Cd79b в модели ксенотрансплантата CARNAVAL

Клетки CARNAVAL поддерживали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Клетки CARNAVAL (5×10^5 клеток) в логарифмической фазе роста имплантировали подкожно мышам NOD/scid/IL-2Rg^{-/-} (NSG) в день 0. Клетки CAR-T (эталонный CAR 441 HL или CD19 4-1BBz) получали следующим образом: первичные Т-клетки человека размораживали и оставляли на ночь в среде TechMACS с добавлением 300 МЕ/мл IL-2. На следующий день после оттаивания Т-клетки стимулировали гранулами TransAct в соответствии с инструкциями производителя; Через 24 часа после стимуляции клетки трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими конструкции CAR, при множественности инфицирования (MOI) 5. Т-клетки культивировали в течение 14 дней перед сбором и замораживанием в среде Cryostor CS10. Во время культивирования среду и цитокин обновляли каждые 2–4 дня. Экспрессию CAR CD79b количественно определяли посредством проточной цитометрии с использованием рекомбинантного внеклеточного домена CD79b человека, слитого с белком AF647. Когда средний объем опухоли в группе достигал приблизительно $50\text{--}100 \text{ мм}^3/\text{мышь}$ примерно через 14 дней после имплантации, вводили указанные дозы клеток CAR⁺-Т (дозы 1×10^6 клеток, 2×10^6 клеток и 4×10^6 клеток для состояний 441 HL и CD19 4-1BBz; доза 1×10^6 клеток для состояния UTD) внутривенно (**фиг. 13А**). Нетрансдуцированные клетки CAR-T добавляли для нормализации количества как CAR, так и общих Т-клеток, вводимых для каждого CAR. Объем опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем (**фиг. 13В**) вместе с массой тела (**фиг. 13С**). CAR 441-HL опосредовали ингибирование роста опухоли в зависимости от дозы, при этом сопутствующая потеря массы тела не наблюдалась. К дню 47 у мышей развивался синдром высвобождения цитокинов (CRS) в группе с дозой 4×10^6 клеток CAR-T 441-HL.

Литература

1. Kochenderfer, J.N. et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol* **33**, 540-549 (2015).
2. Schuster, S.J. et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* 377;2545-2554 (2017).
3. Shalabi, H. et al. Sequential loss of tumor surface antigens following chimeric antigen receptor T-cell therapies in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* **103**, e215-e218 (2018).

4. Sotillo, E. et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Res* **5**, 1282-1295 (2015).
5. Packard, T.A. & Cambier, J.C. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Rep* **5**, 40 (2013).
6. Puri, K.D., Di Paolo, J.A. & Gold, M.R. B-cell receptor signaling inhibitors for treatment of autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Parasite Immunol* **32**, 397–427 (2013).
- 10 7. Polson, A.G. et al. Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **110**, 616-623 (2007).
8. Palanca-Wessels, M.C.A. et al. Safety and activity of the anti-CD79B antibody–drug conjugate polatuzumab vedotin in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1 study. *The Lancet Oncology* **16**, 704-715 (2015).
- 15 9. Astsaturov, I.A. et al. Differential expression of B29 (CD79b) and mb-1 (CD79a) proteins in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* **10**, 769-773 (1996).

Содержание всех патентов, опубликованных заявок и ссылок, упоминаемых в данном документе, включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Несмотря на то, что иллюстративные варианты осуществления данного изобретения были конкретным образом представлены и описаны в данном документе, специалистам в соответствующей области техники будет понятно, что в данное изобретение могут быть внесены различные изменения в форме и деталях, без отступления от объема вариантов осуществления данного изобретения, охватываемых прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

(a) внеклеточный домен, который специфически связывается с антигеном
5 CD79b;

(b) трансмембранный домен; и

(c) внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по
меньшей мере один костимулирующий домен.

10 2. CAR по п. 1, дополнительно включающий

(d) шарнирную область CD8a,

где трансмембранный домен включает полипептид CD8a трансмембранной
области (CD8a-TM); и

где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен,
15 содержащий компонент члена 9 суперсемейства TNF-рецепторов (CD137) и первичный
сигнальный домен, содержащий компонент дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного
гликопротеина Т-клеток.

3. CAR по п. 2, отличающийся тем, что

20 шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность,
которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 38;

трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность,
которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 39; и/или

25 внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен,
имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 %
идентична SEQ ID NO: 40, и первичный сигнальный домен, имеющий
аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична
SEQ ID NO: 41.

30 4. Химерный антигенный рецептор (CAR – англ.: chimeric antigen receptor),
содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и
внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий
домен содержит:

NO: 254, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 255;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 243, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264;

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 269, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 270; или

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 275, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 276;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

5. CAR по п. 4, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259.

6. Химерный антигенный рецептор (CAR – англ.: chimeric antigen receptor), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213;

NO: 236, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 252;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 251, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 267;

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 271, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 272, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273; или

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 277, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

7. CAR по п. 6, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262.

8. CAR по п. 4 или п. 5, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 251, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 252;

5 CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 251, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256;

10 CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262;

15 CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 267;

20 CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 271, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 272, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 273; или

25 CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 277, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278.

9. CAR по п. 8, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262.

30

10. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208, 216, 222, 228, 232, 238, 242, 248, 253, 257, 263, 268 или 274, CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 209, 217, 223, 233, 239, 243, 249, 254, 258, 269 или 275, CDR3 тяжелой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 210, 218, 224, 229, 234, 240, 244, 250, 255, 259, 264, 270 или 276, CDR1 легкой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 211, 214, 215, 219, 225, 230, 235, 241, 245, 251, 260, 265, 271 или 277, CDR2 легкой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 212, 220, 226, 231, 236, 246, 261, 266 или 272 и CDR3 легкой цепи содержит аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 213, 221, 227, 237, 247, 252, 256, 262, 267, 273 или 278.

11. CAR по любому из пп. 1–10, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность

- a) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211, 212 и 213, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 214, 212 и 213, соответственно;
- c) SEQ ID NO: 208, 209, 210, 215, 212 и 213, соответственно;
- d) SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220 и 221, соответственно;
- e) SEQ ID NO: 222, 223, 224, 225, 226 и 227, соответственно;
- f) SEQ ID NO: 228, 217, 229, 230, 231 и 221, соответственно;
- g) SEQ ID NO: 232, 233, 234, 235, 236 и 237, соответственно;
- h) SEQ ID NO: 238, 239, 240, 241, 226 и 227, соответственно;
- i) SEQ ID NO: 242, 243, 244, 245, 246 и 247, соответственно;
- j) SEQ ID NO: 248, 249, 250, 251, 236 и 252, соответственно;
- k) SEQ ID NO: 253, 254, 255, 251, 236 и 256, соответственно;
- l) SEQ ID NO: 257, 258, 259, 260, 261 и 262, соответственно;
- m) SEQ ID NO: 263, 243, 264, 265, 266 и 267, соответственно;
- n) SEQ ID NO: 268, 269, 270, 271, 272 и 273, соответственно; или
- o) SEQ ID NO: 274, 275, 276, 277, 266 и 278, соответственно.

12. CAR по любому из пп. 1–11, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи,

CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, 258, 259, 260, 261 и 262, соответственно.

5 13. Химерный антигенный рецептор (CAR – англ.: chimeric antigen receptor), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

10 вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-18; и/или

 вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 19-36;

15 причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

14. CAR по п. 13, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

20 вариабельный домен (VH) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-18; и/или

 вариабельный домен (VL) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19-36;

 причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген CD79b.

25 15. CAR по п. 13, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 19;

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 35;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 33; или

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 36.

16. CAR по любому из пп. 13–15, отличающийся тем, что внеклеточный
15 антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, 15 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

17. CAR по п. 13 или п. 15, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 32.

25 18. CAR по любому из пп. 13–17, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

30 19. CAR по любому из пп. 1–18, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), scFv содержит вариабельную область легкой цепи (VH) и вариабельную область тяжелой цепи (VL).

20. CAR по п. 19, отличающийся тем, что scFv содержит линкерный полипептид между
вариабельной областью тяжелой цепи (VH) и вариабельной областью легкой цепи
(VL).
- 5 21. CAR по п. 20, отличающийся тем, что линкерный полипептид содержит
аминокислотную последовательность, меньшей мере на 90 % идентичную SEQ ID
NO: 42.
- 10 22. CAR по п. 20 или п. 21, отличающийся тем, что линкерный полипептид содержит
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.
- 15 23. CAR по любому из пп. 19–22, отличающийся тем, что scFv содержит
аминокислотную последовательность, меньшей мере на 90 % идентичную
последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 75-118.
- 20 24. CAR по любому из пп. 19–23, отличающийся тем, что scFv содержит
аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID
NO: 75-118.
- 25 25. CAR по любому из пп. 19–23, отличающийся тем, что scFv содержит
аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична
SEQ ID NO: 113.
26. CAR по любому из пп. 19–25, отличающийся тем, что scFv содержит
25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113.
27. CAR по любому из пп. 1–26, отличающийся тем, что внеклеточный
антигенсвязывающий домен содержит сигнальный полипептид.
- 30 28. CAR по п. 27, отличающийся тем, что сигнальный полипептид содержит
аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична
последовательности SEQ ID NO: 37.

29. CAR по п. 27 или п. 28, отличающийся тем, что сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

30. CAR по любому из пп. 4–29, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента члена суперсемейства дифференцировки и их комбинации.

31. CAR по п. 30, отличающийся тем, что компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична последовательности SEQ ID NO: 40.

32. CAR по п. 30 или п. 31, отличающийся тем, что компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

33. CAR по любому из пп. 30–32, отличающийся тем, что компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 41.

34. CAR по любому из пп. 30–33, отличающийся тем, что компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

35. CAR по любому из пп. 30–34, отличающийся тем внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична последовательности SEQ ID NO: 163.

36. CAR по любому из пп. 30–35, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163.

37. CAR по любому из пп. 4–36, отличающийся тем, что трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM).

38. CAR по п. 37, отличающийся тем, что полипептид CD8a-ТМ содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична последовательности SEQ ID NO: 39.

5 39. CAR по п. 37 или п. 38, отличающийся тем, что полипептид CD8a-ТМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

40. CAR по любому из пп. 4–39, дополнительно содержащий шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

10

41. CAR по п. 40, отличающийся тем, что шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8a.

15 42. CAR по п. 41, отличающийся тем, что шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, меньшей мере на 90 % идентичную SEQ ID NO: 38.

43. CAR по п. 41 или п. 42, отличающийся тем, что шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

20

44. CAR по любому из пп. 1–43, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119-162, или последовательности, на 90% идентичной ей.

25

45. CAR по любому из пп. 1–44, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 157.

30

46. CAR по любому из пп. 1–45, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

47. CAR по любому из пп. 1–46, причем CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164-207, или последовательности, на 90% идентичной ей.

5 48. CAR по любому из пп. 1–47, причем CAR содержит аминокислотную последовательность, которая меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO: 202.

49. CAR по любому из пп. 1–48, причем CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202.

10

50. Выделенный лимфоцит, экспрессирующий CAR по любому из пп. 1–49.

51. Выделенный лимфоцит по п. 50, отличающийся тем, что лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит.

15

52. Выделенный лимфоцит по п. 51, отличающийся тем, что Т-лимфоцит представляет собой натуральную клетку-киллер (NK).

53. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по любому из пп. 1–49.

20

54. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 53.

55. Клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 53.

25

56. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество лимфоцитов по любому из пп. 50–52 и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

57. Способ лечения субъекта, имеющего рак, причем указанный способ включает:

30

введение субъекту терапевтически эффективного количества лимфоцита по любому из пп. 50–52 или фармацевтической композиции по пп. 56, при этом лимфоцит индуцирует уничтожение раковых клеток у субъекта.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что рак представляет собой В-клеточную лимфому.

59. Способ по п. 57 или п. 58, отличающийся тем, что рак представляет собой
5 неходжкинскую лимфому.

60. Способ по любому из пп. 57–59, отличающийся тем, что указанный рак
представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому
(DLBCL), мантийноклеточную лимфому (MCL), фолликулярную лимфому (FL),
10 лимфому маргинальной зоны (MZ), острый лимфобластный лейкоз (ALL),
хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), множественную миелому (MM),
лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфому Ходжкина,
лимфому Беркитта, волосатоклеточный лейкоз или плазмцитому.

61. Способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий:
15 приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом по любому из пп. 50–52, в
котором лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки.

62. Способ по п. 61, в котором раковая клетка представляет собой злокачественную В-
20 клетку.

63. Способ по п. 61 или п. 62, отличающийся тем, что указанная раковая клетка
представляет собой клетку неходжкинской лимфомы.

64. Способ по любому из пп. 61–63, отличающийся тем, что указанная раковая клетка
представляет собой клетку диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы
(DLBCL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), фолликулярной лимфомы (FL),
лимфомы маргинальной зоны (MZ), острого лимфобластного лейкоза (ALL),
хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), множественной миеломы (MM),
25 лимфомы лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфомы Ходжкина,
лимфомы Беркитта, волосатоклеточного лейкоза или плазмцитомы.

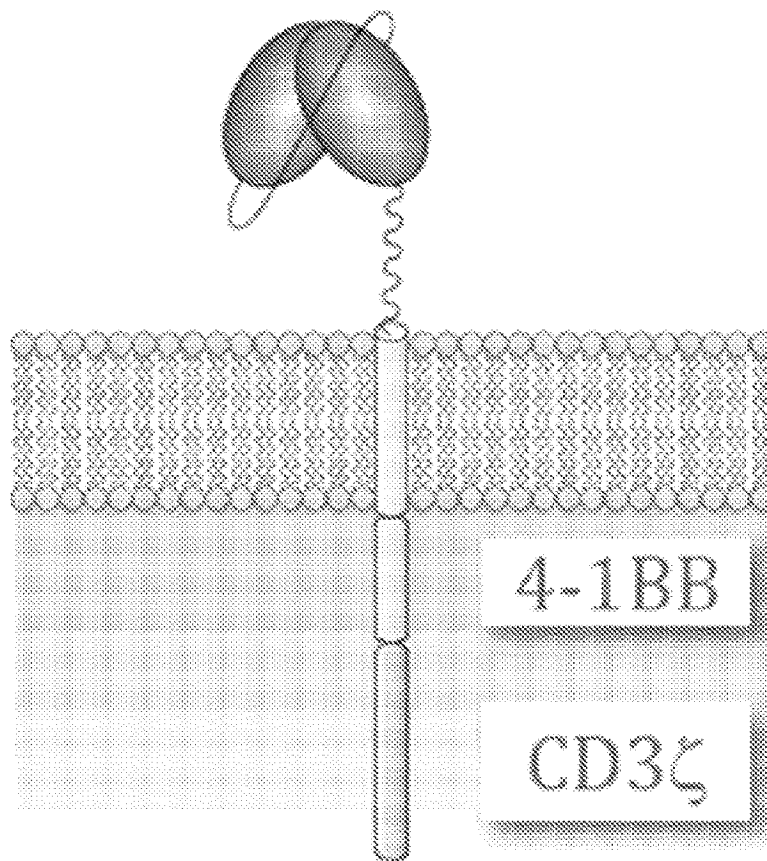
65. Способ обнаружения наличия рака у субъекта, включающий:

приведение образца клеток, полученного от субъекта, в контакт с CAR по пп. 1–49, тем самым формируя комплекс CAR-клетка, и

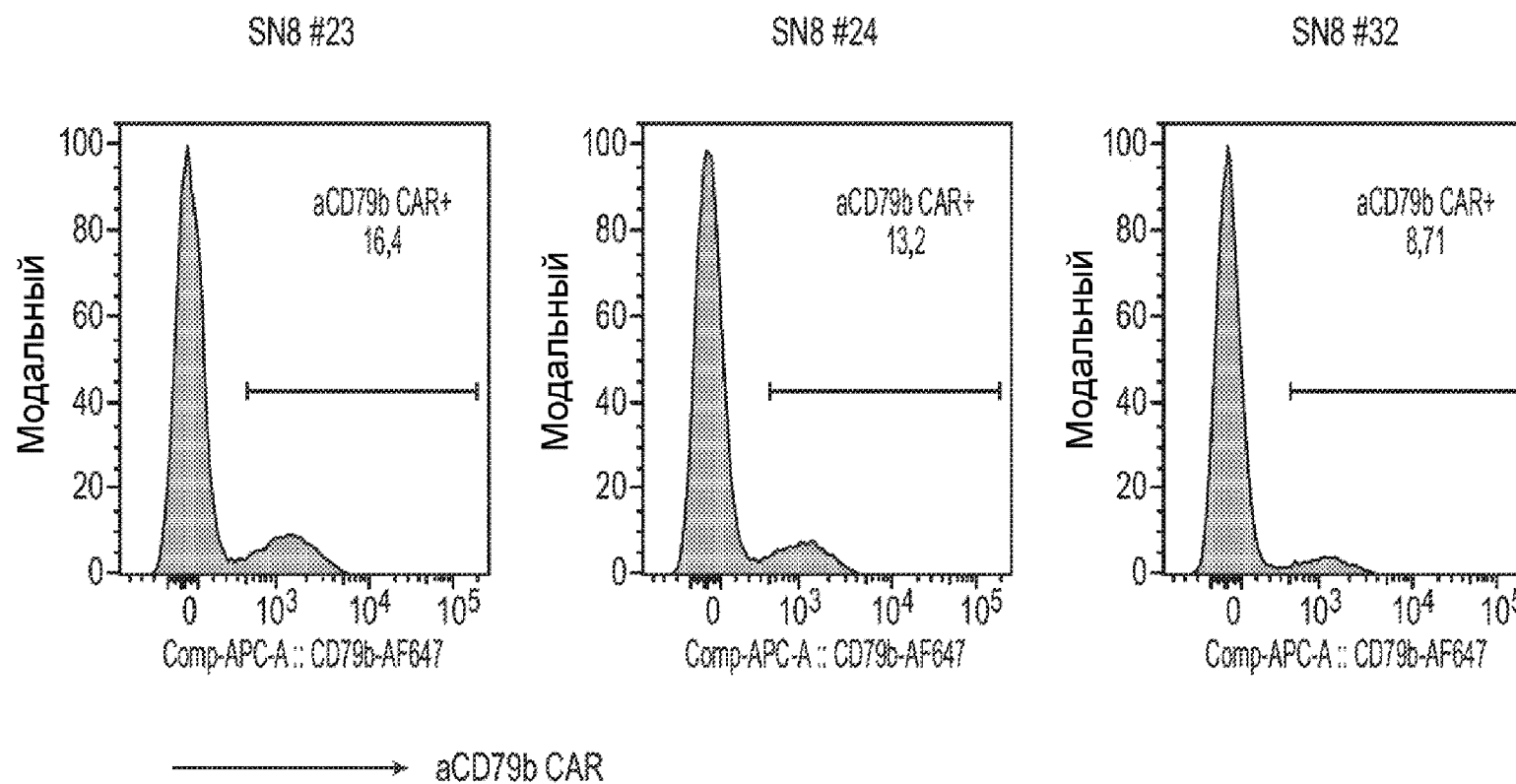
5 обнаружение комплекса, причем обнаружение комплекса указывает на наличие рака у субъекта.

Фиг. 1

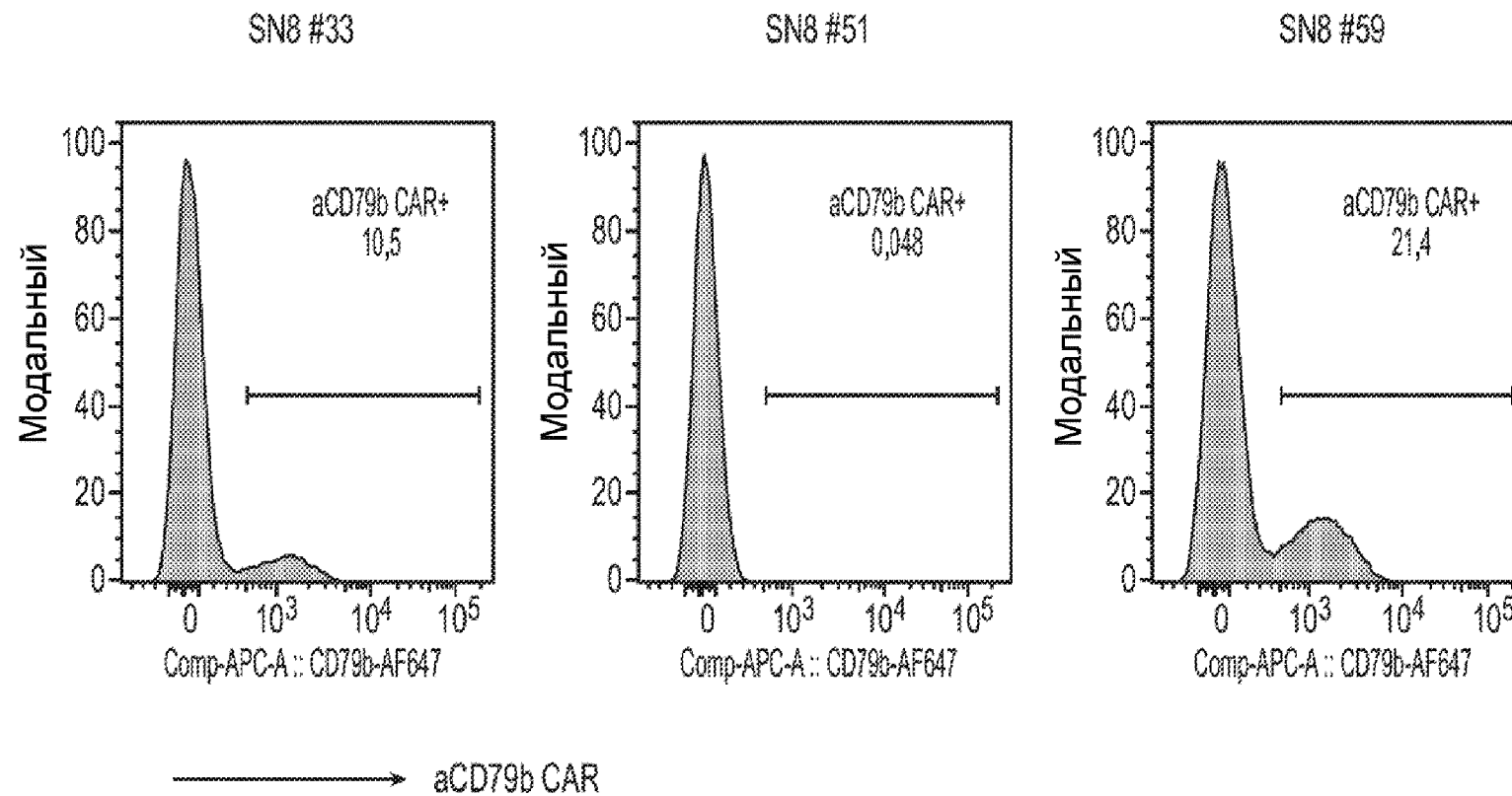
АНТИ-CD79b (scFv)



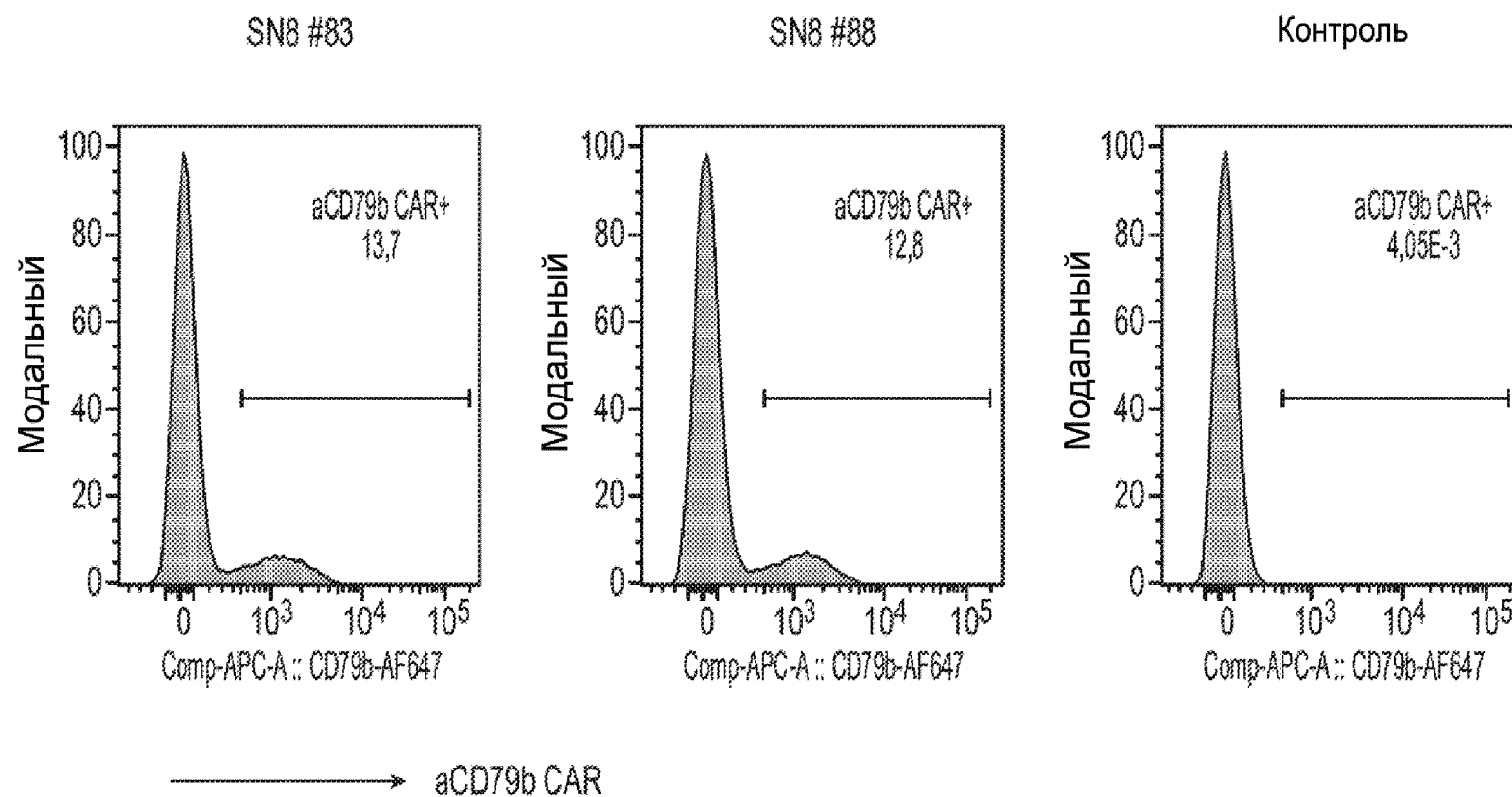
ФИГ. 2А



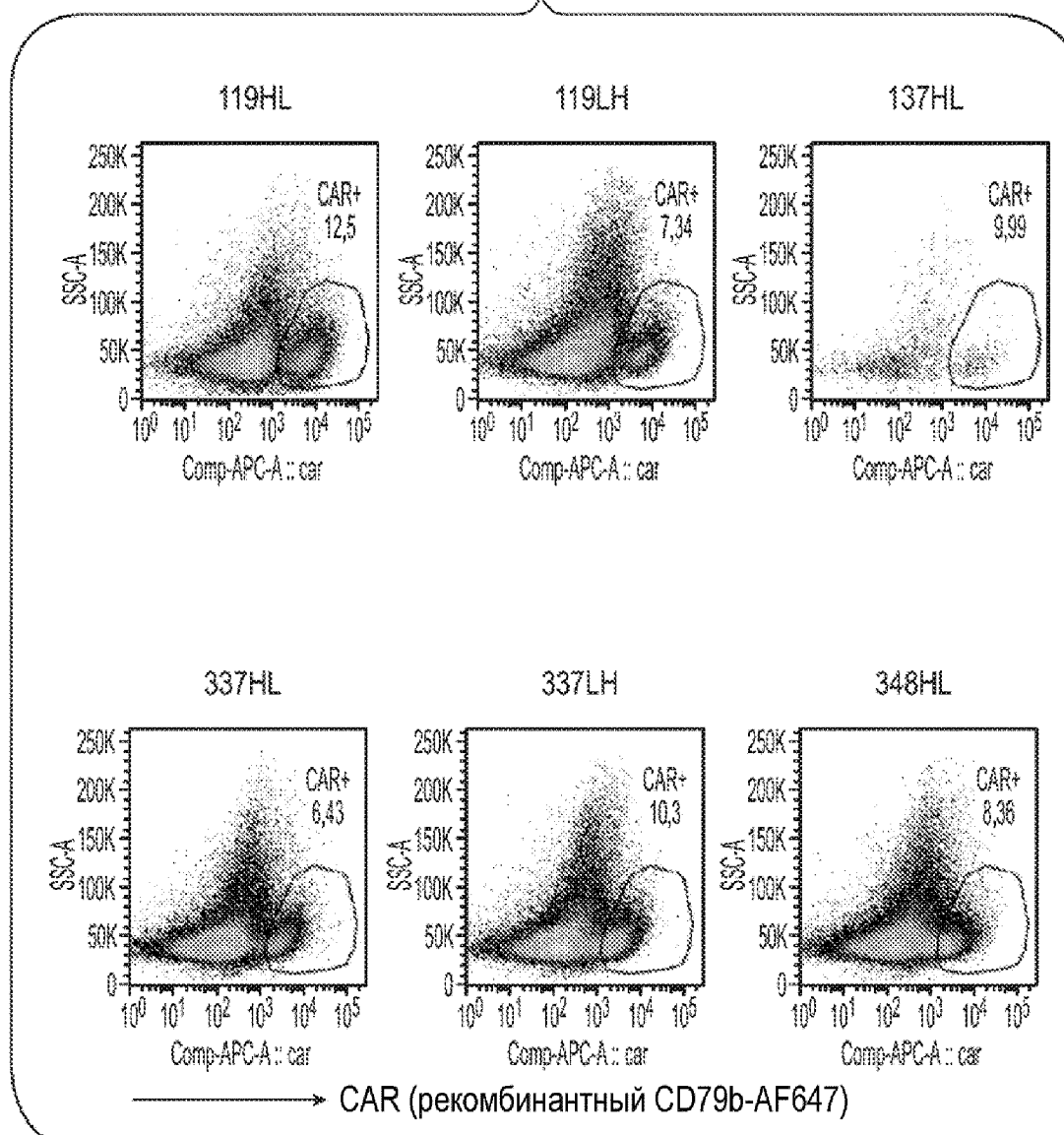
ФИГ. 2В



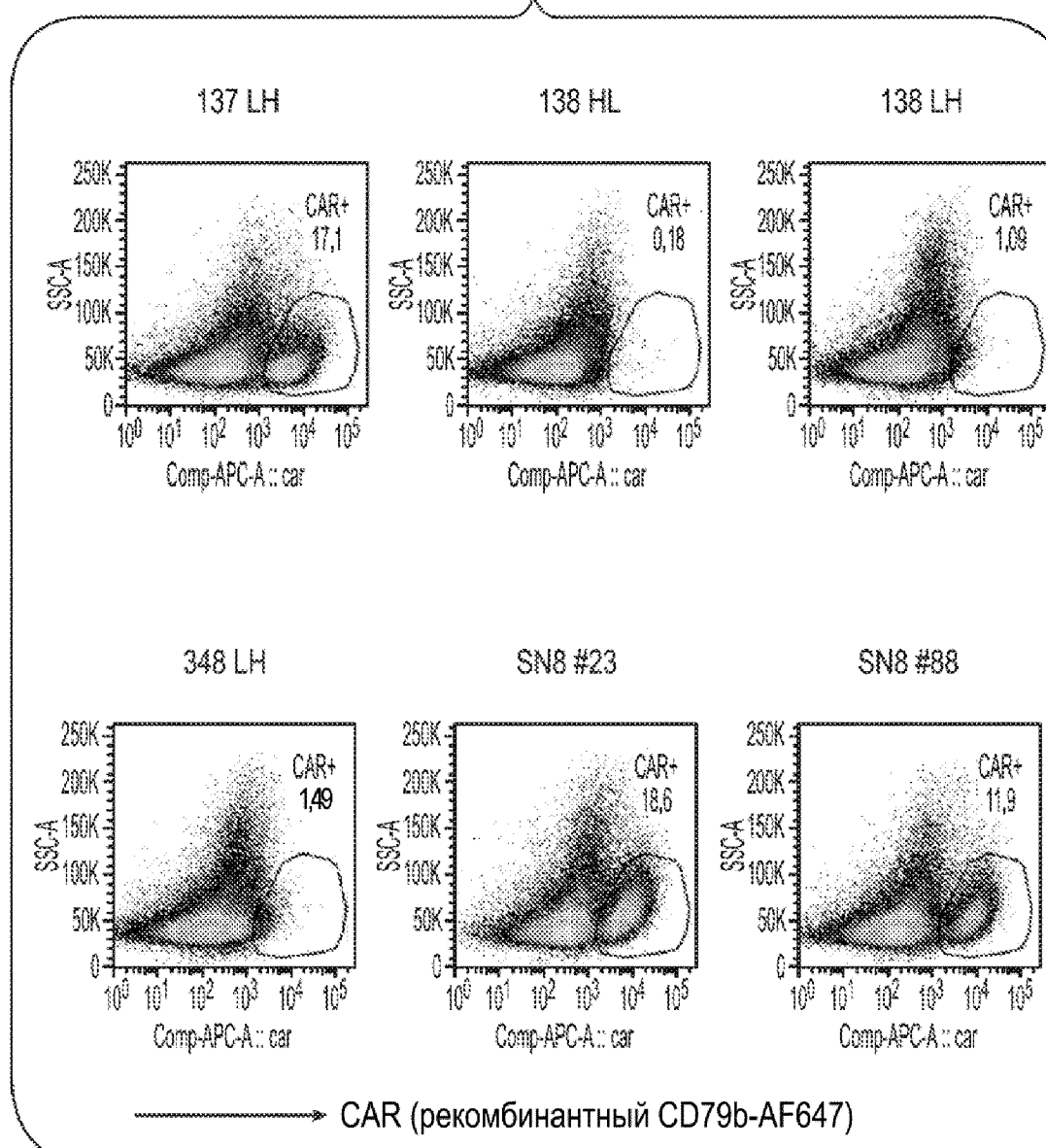
ФИГ. 2С

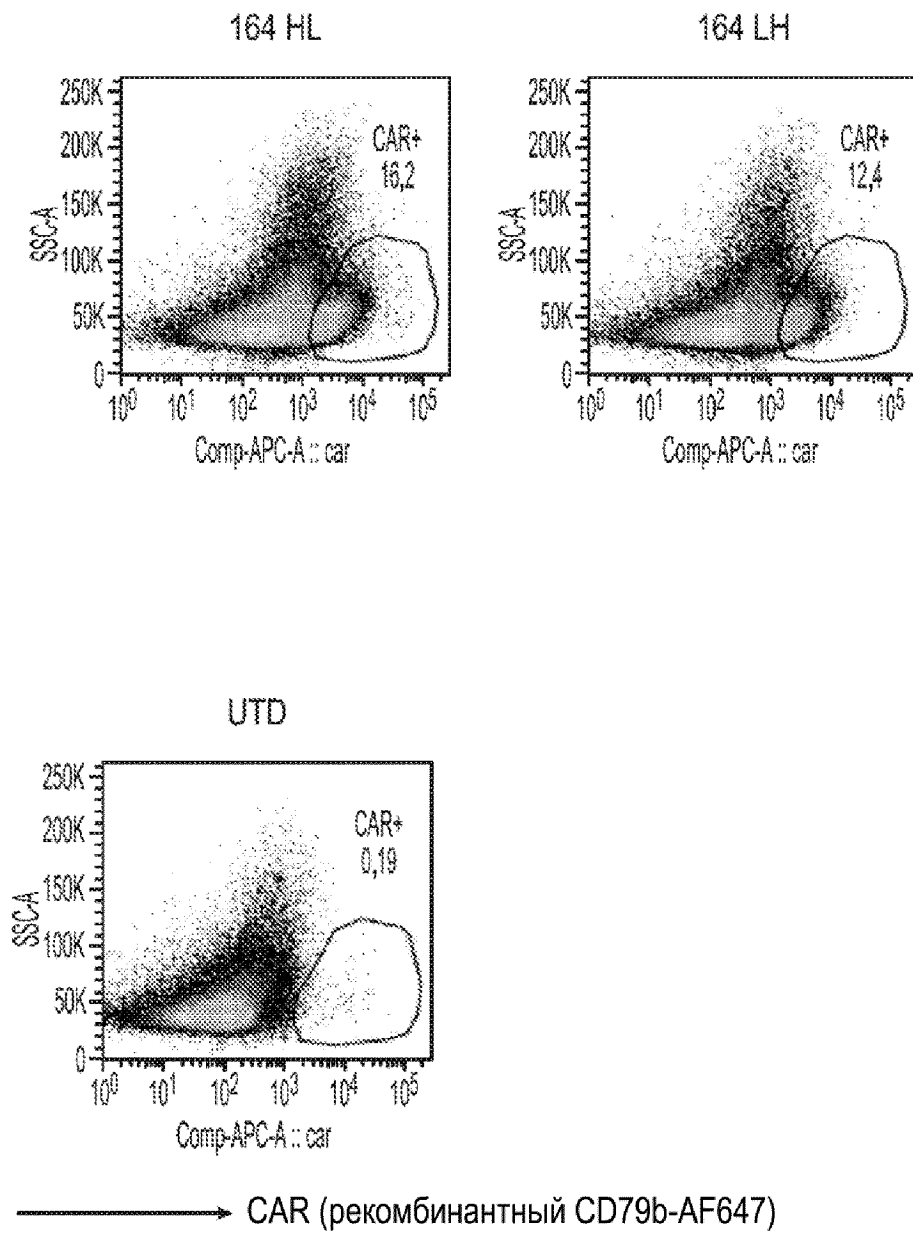


ФИГ. 2D

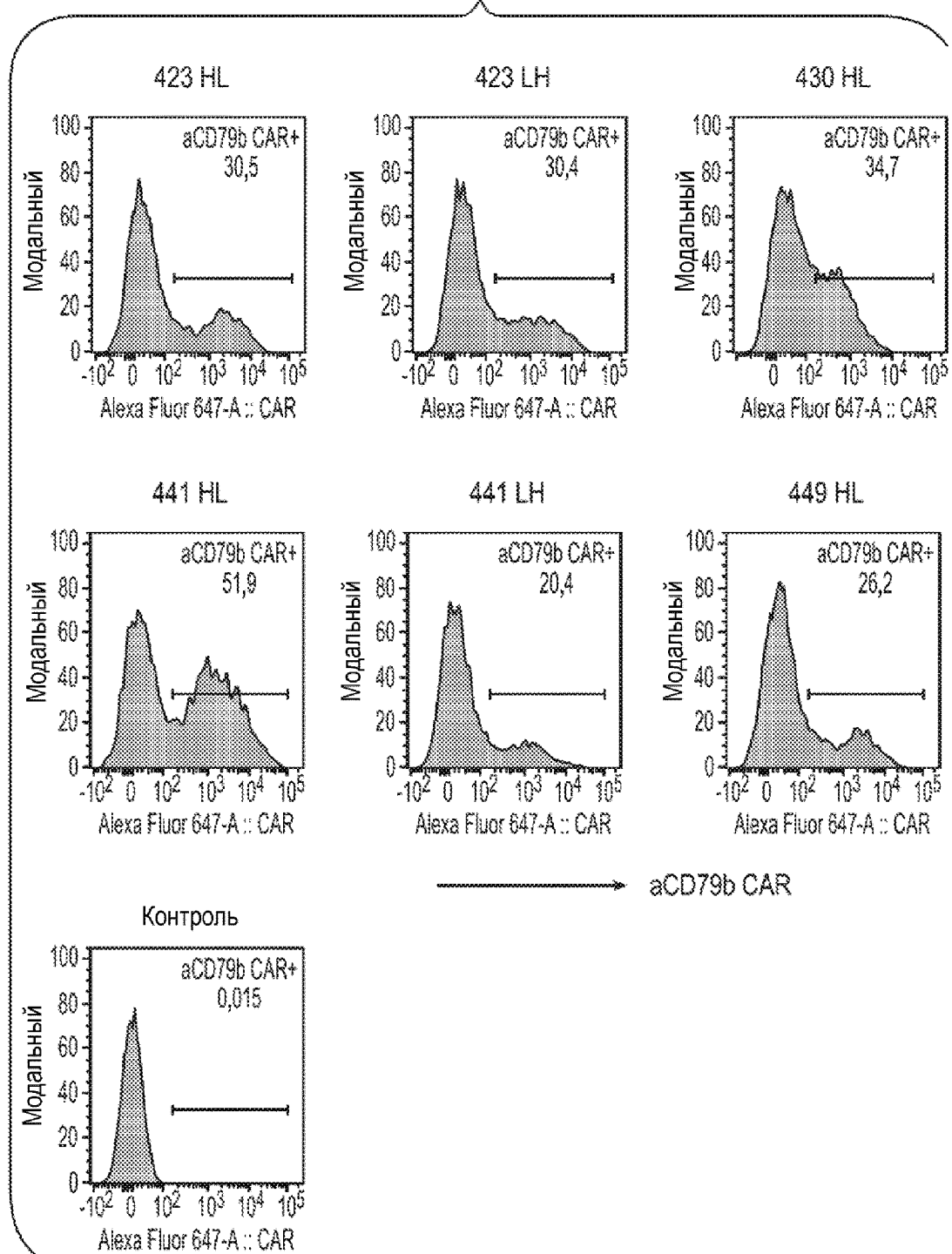


ФИГ. 2Е

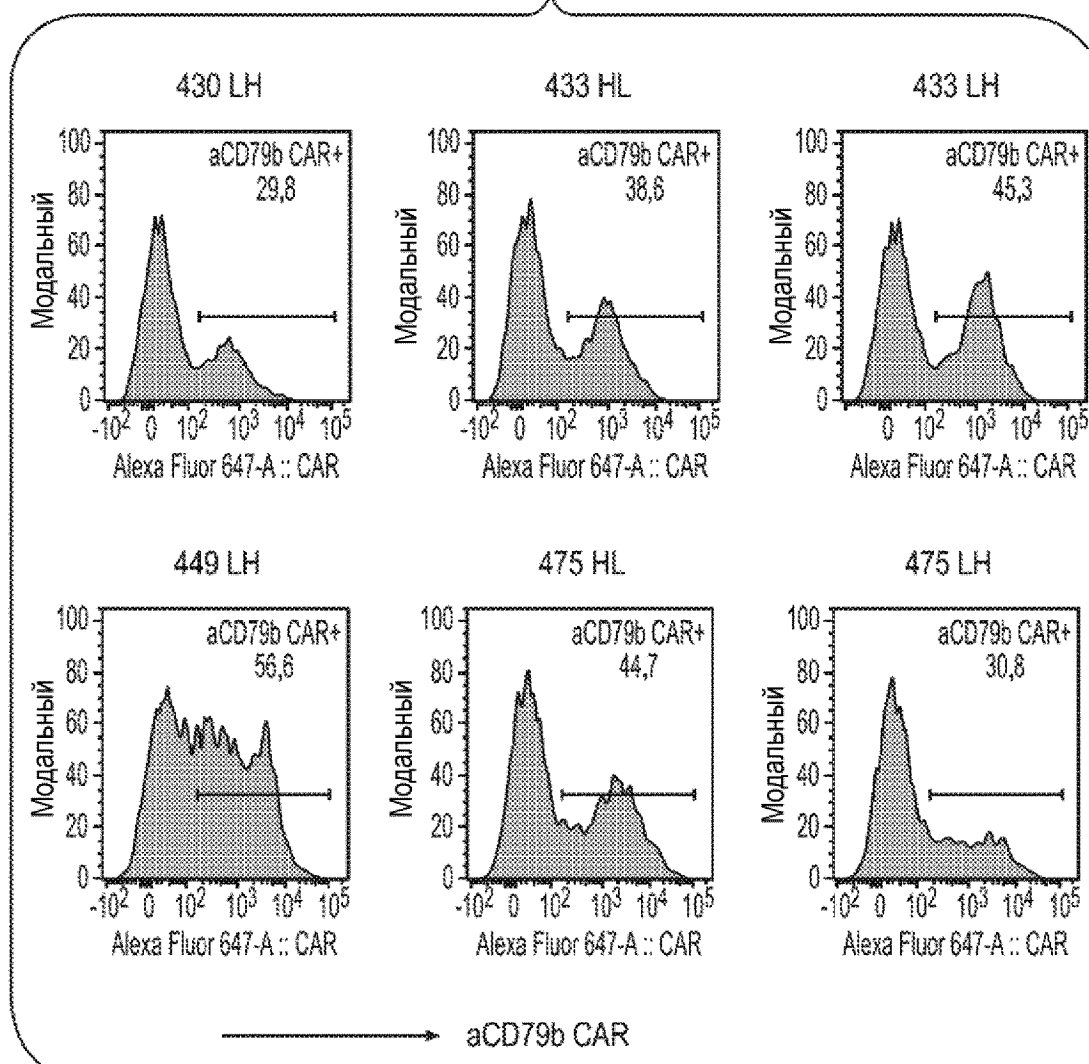


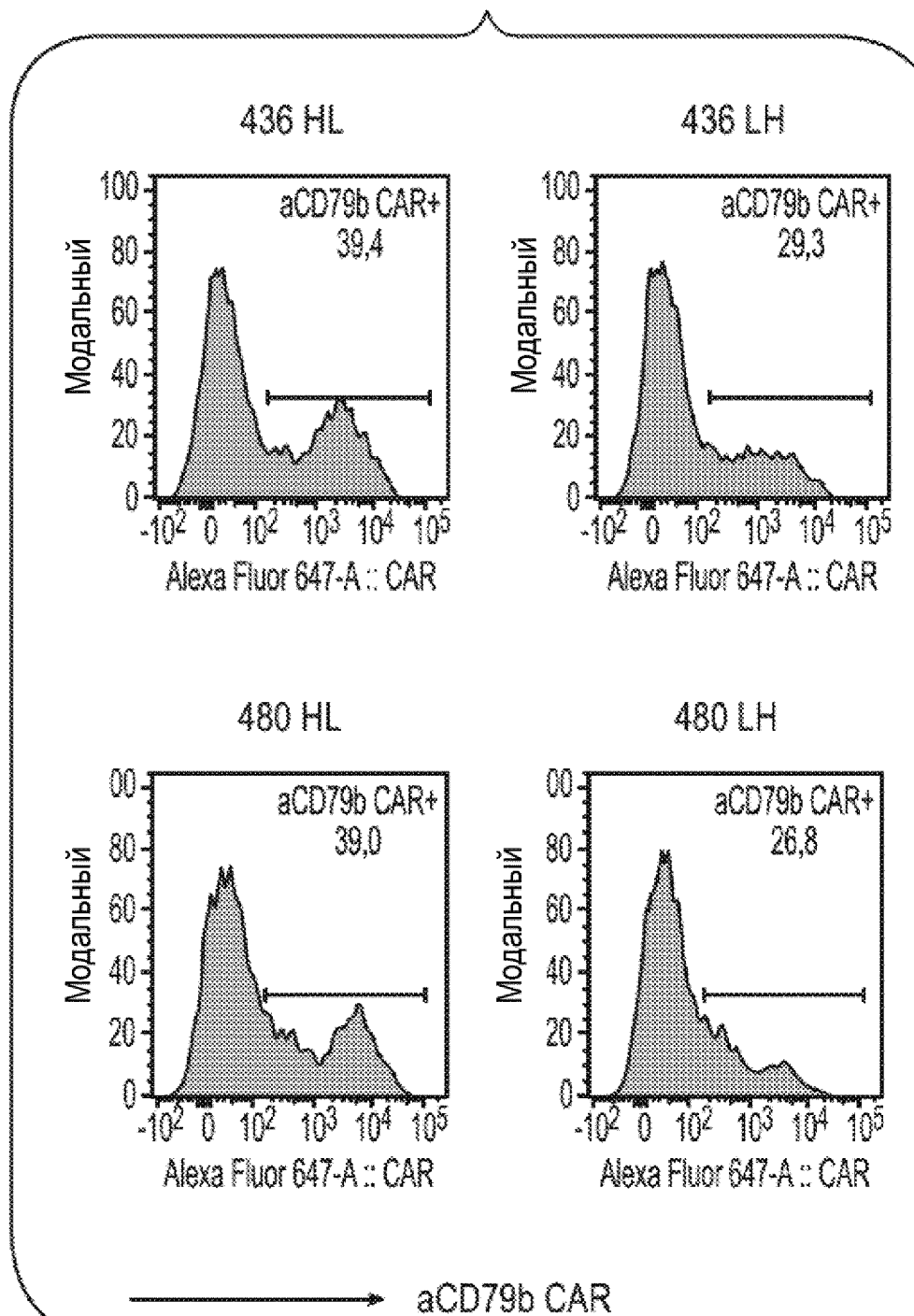
ФИГ. 2F

ФИГ. 2G

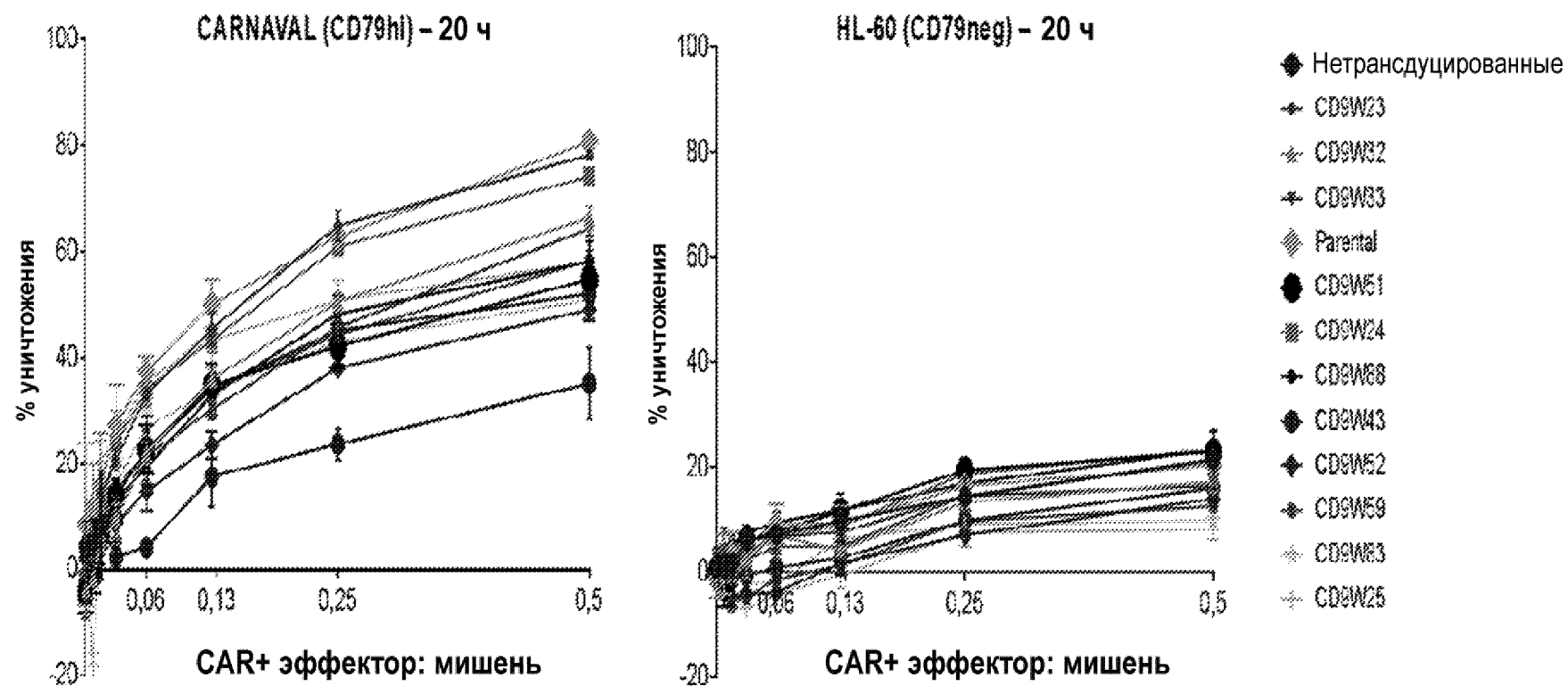


ФИГ. 2Н



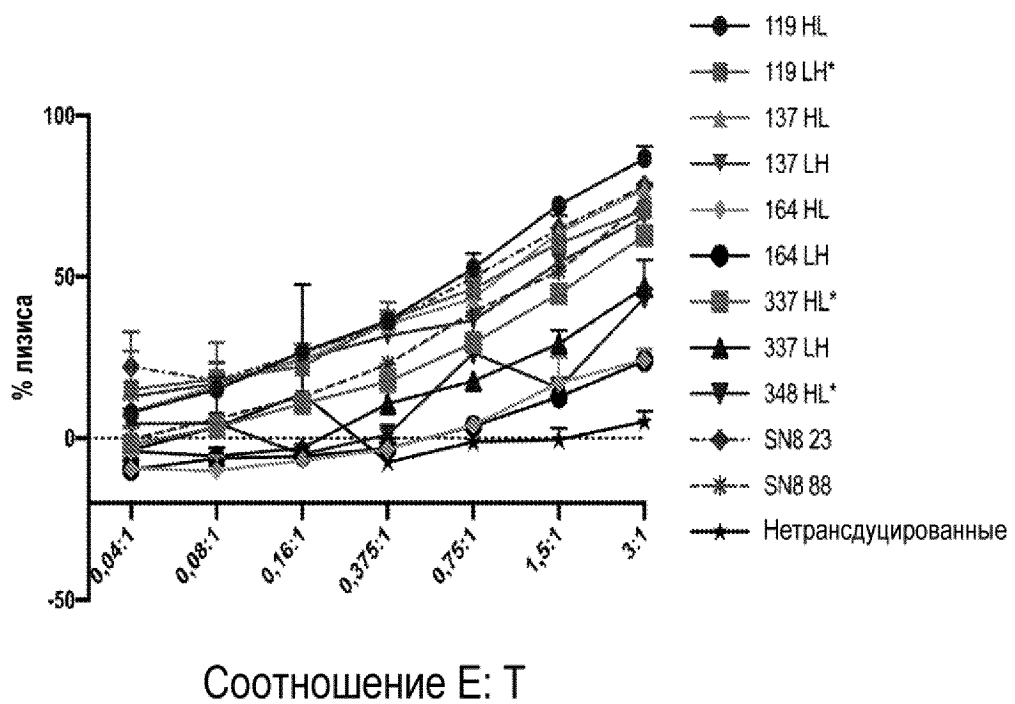
ФИГ. 21

Фиг. 3А



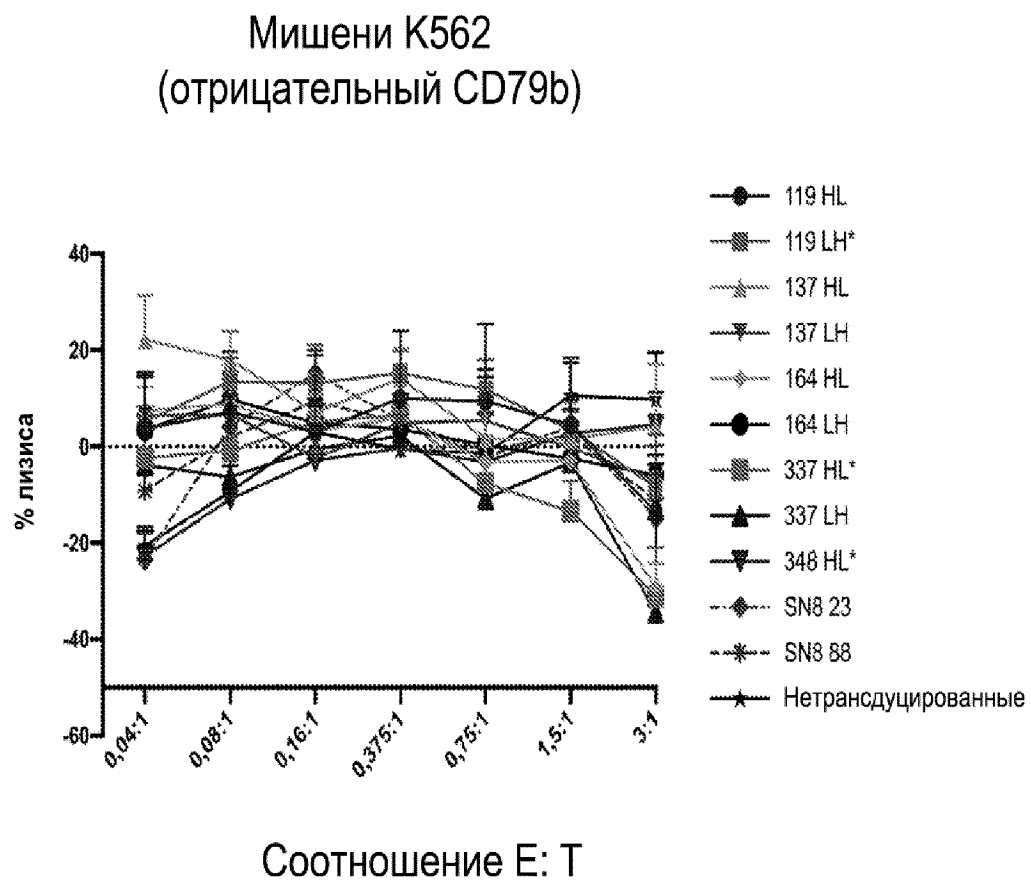
Фиг. 3В

Мишени CARNAVAL (CD79b+)

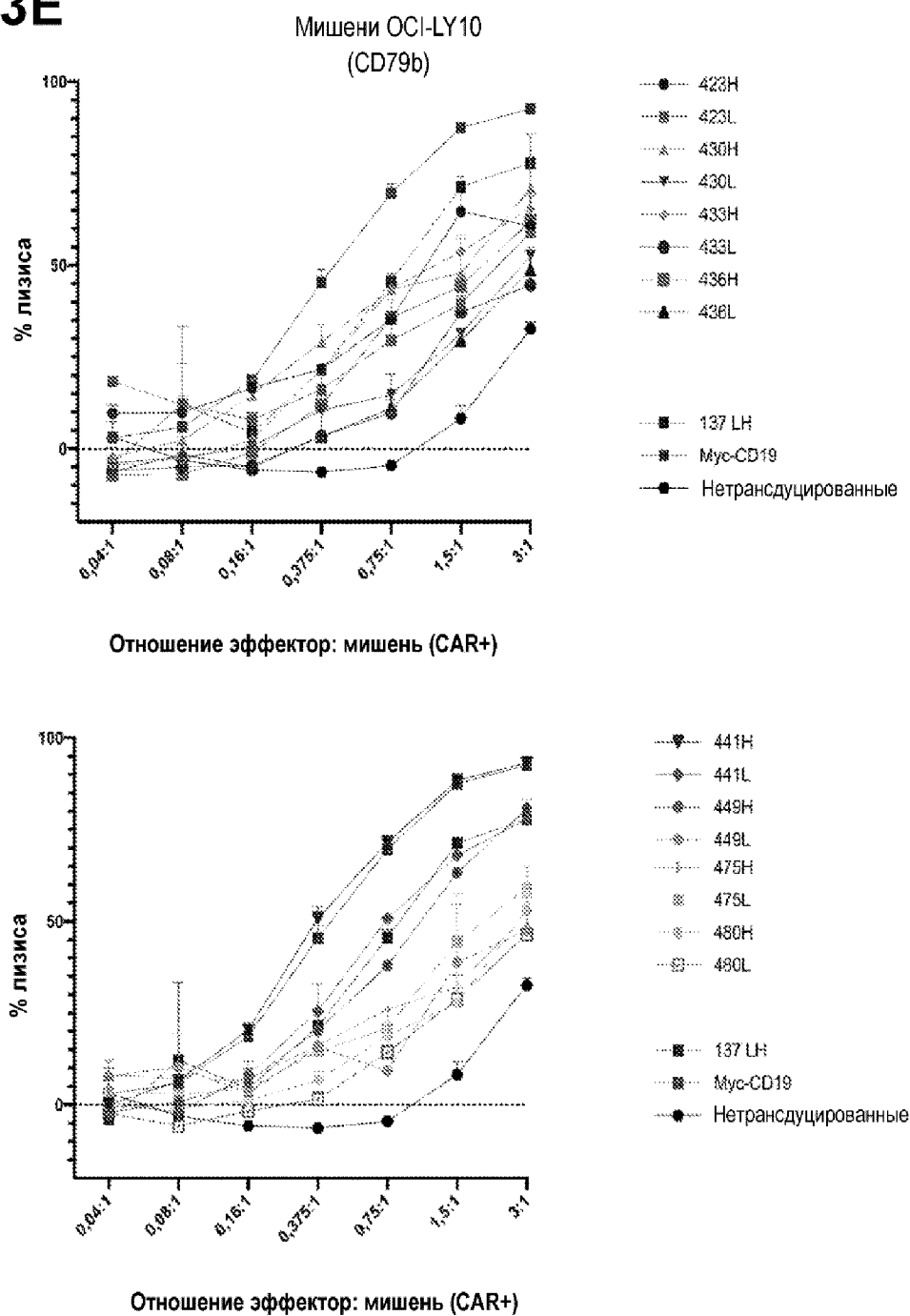




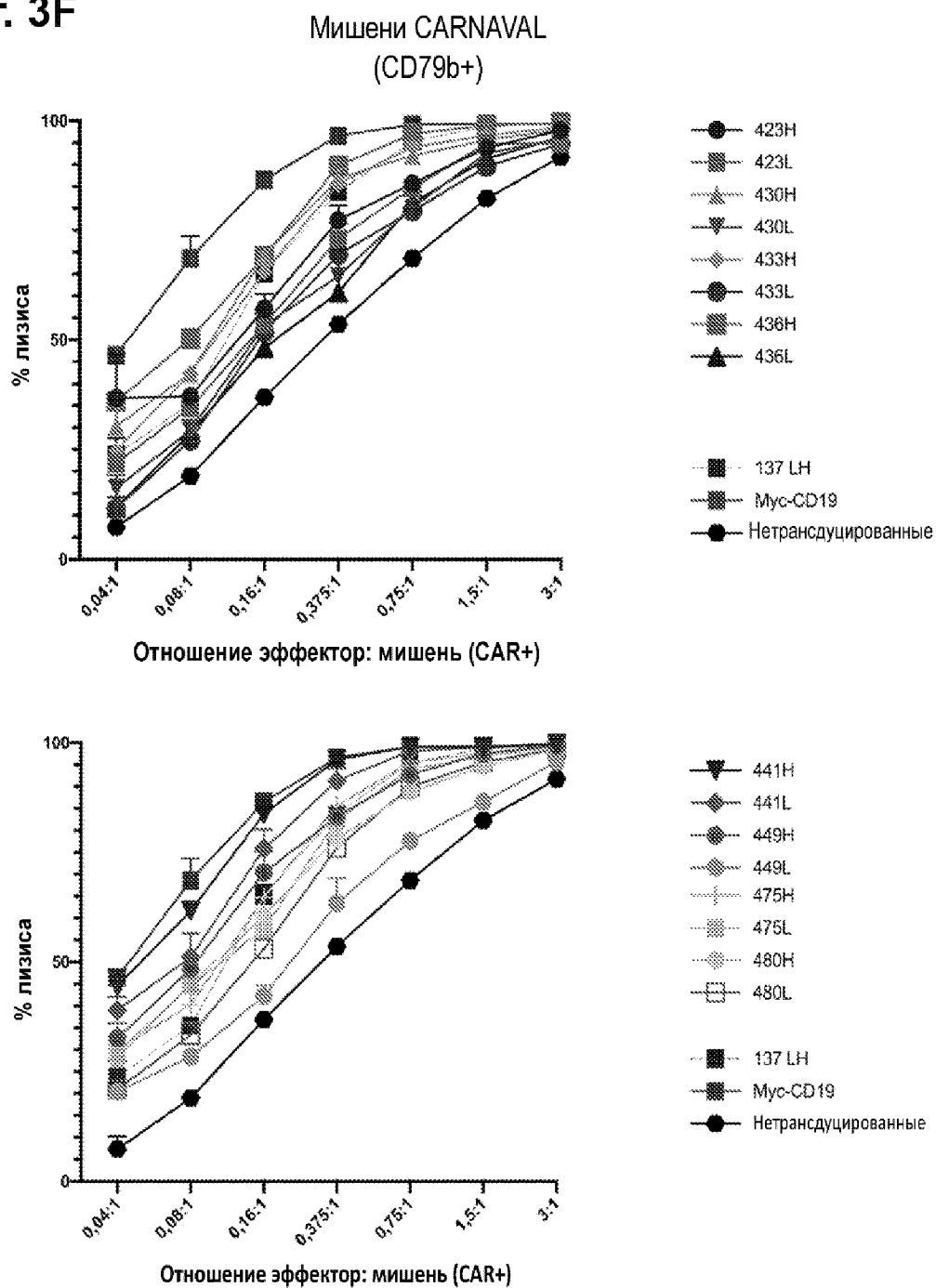
Фиг. 3D



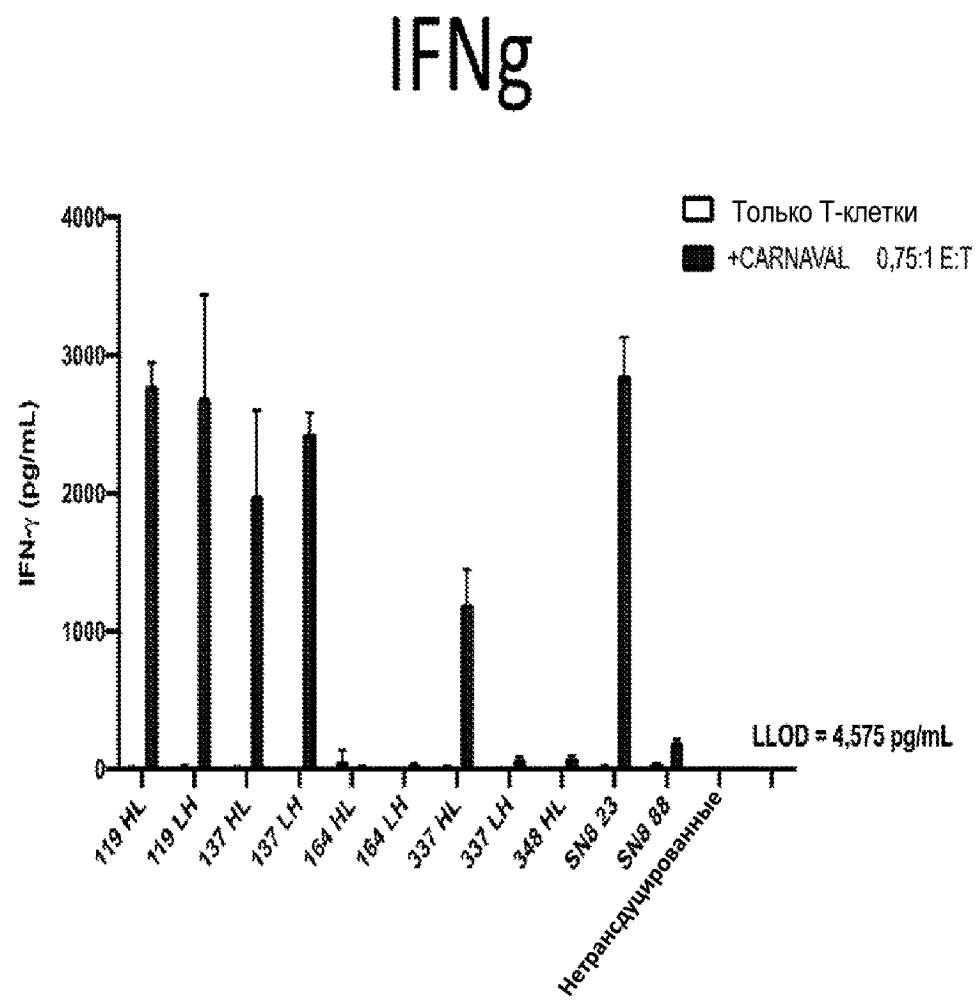
Фиг. 3Е



Фиг. 3F

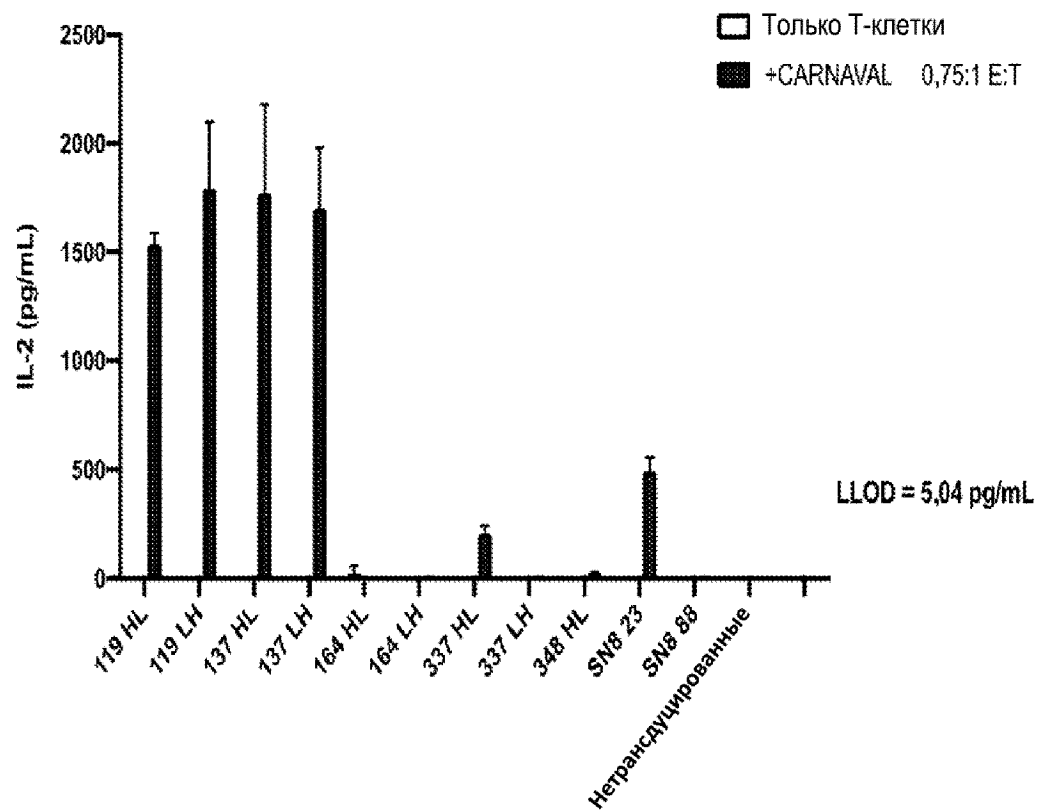


Фиг. 4А

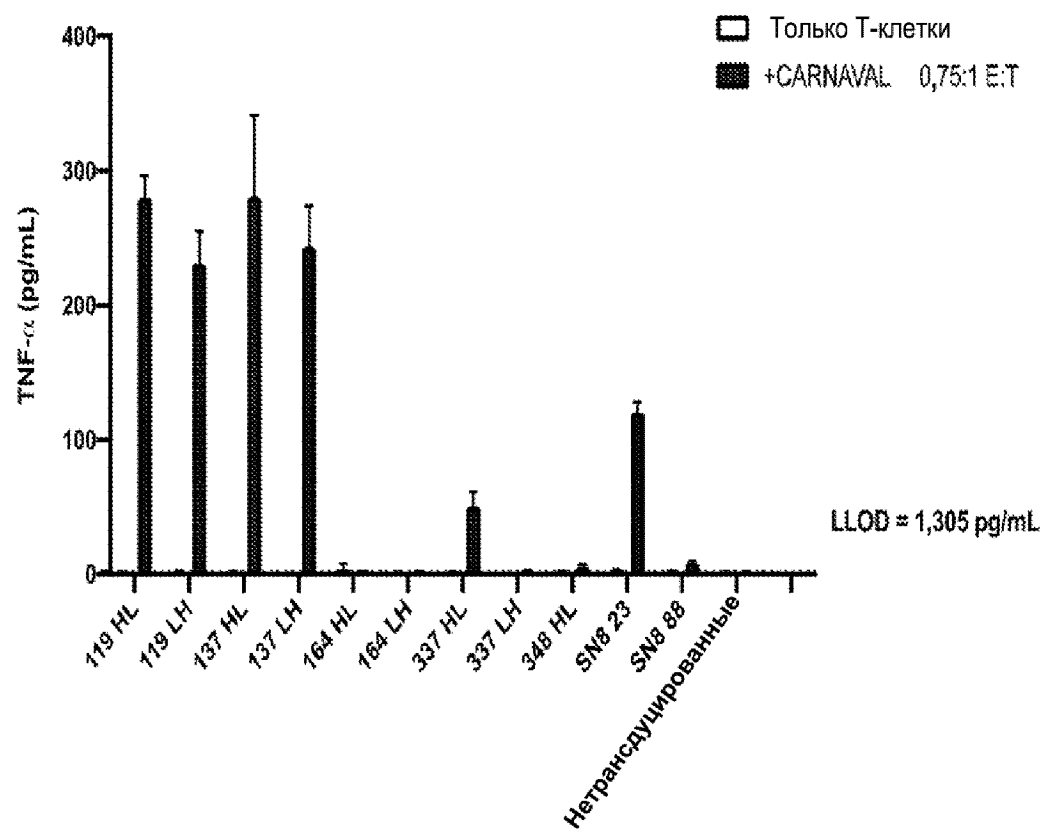


Фиг. 4В

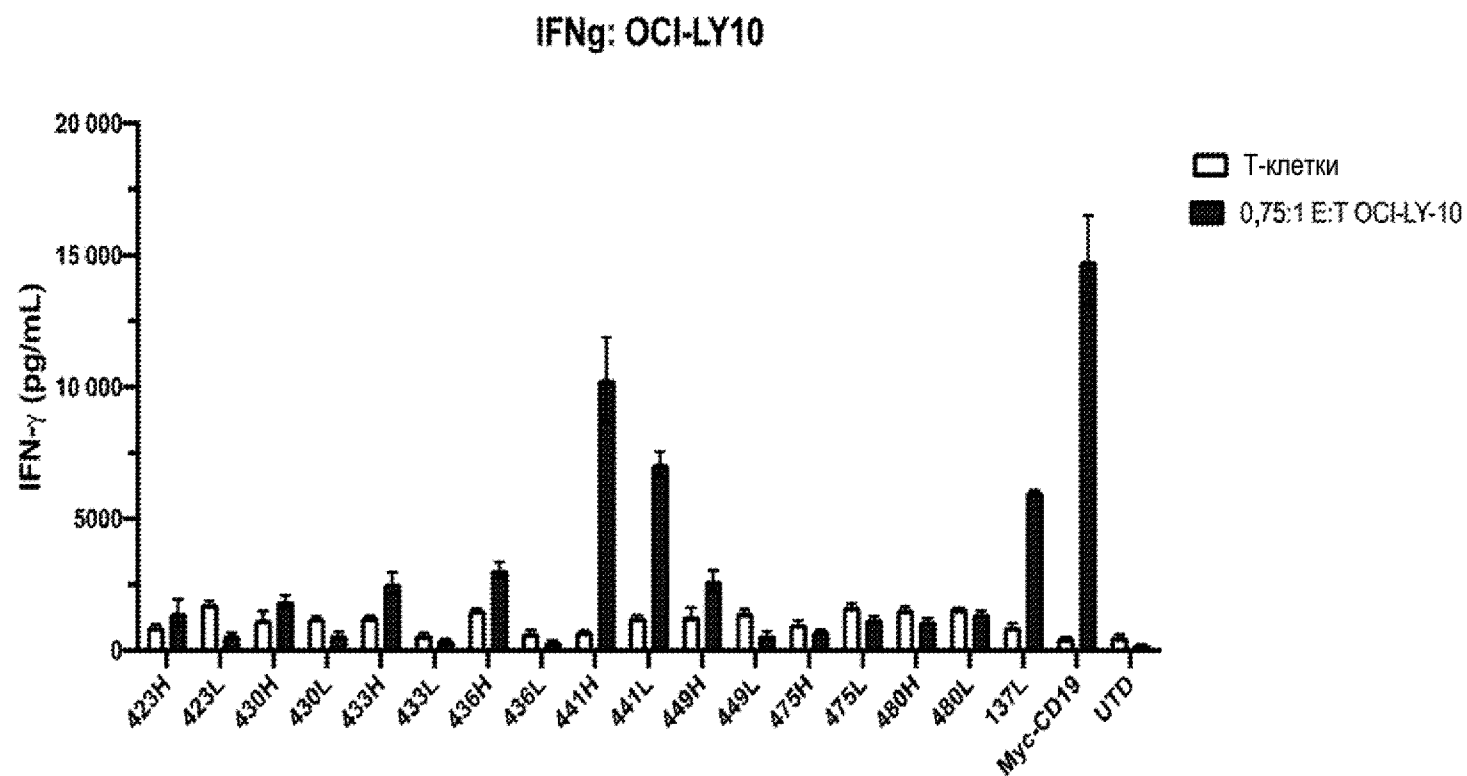
IL-2



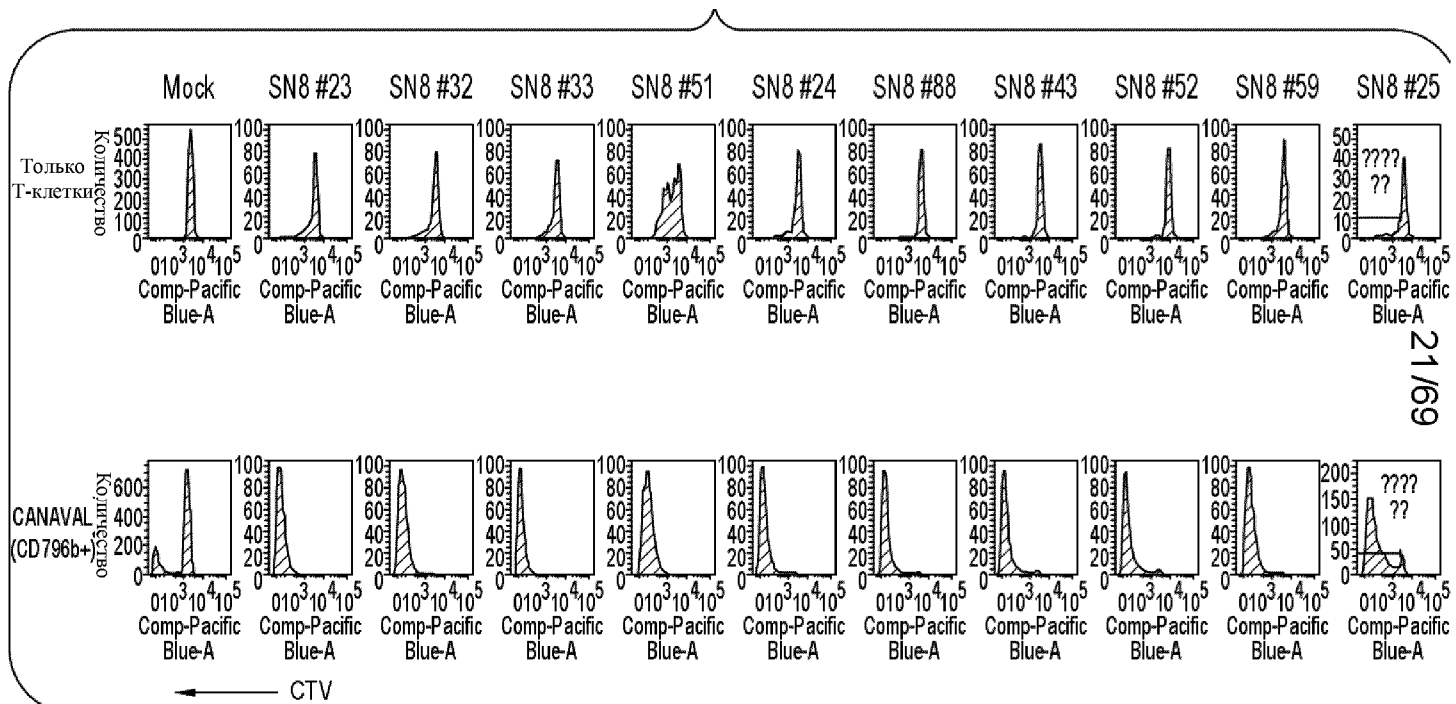
Фиг. 4С

TNF α 

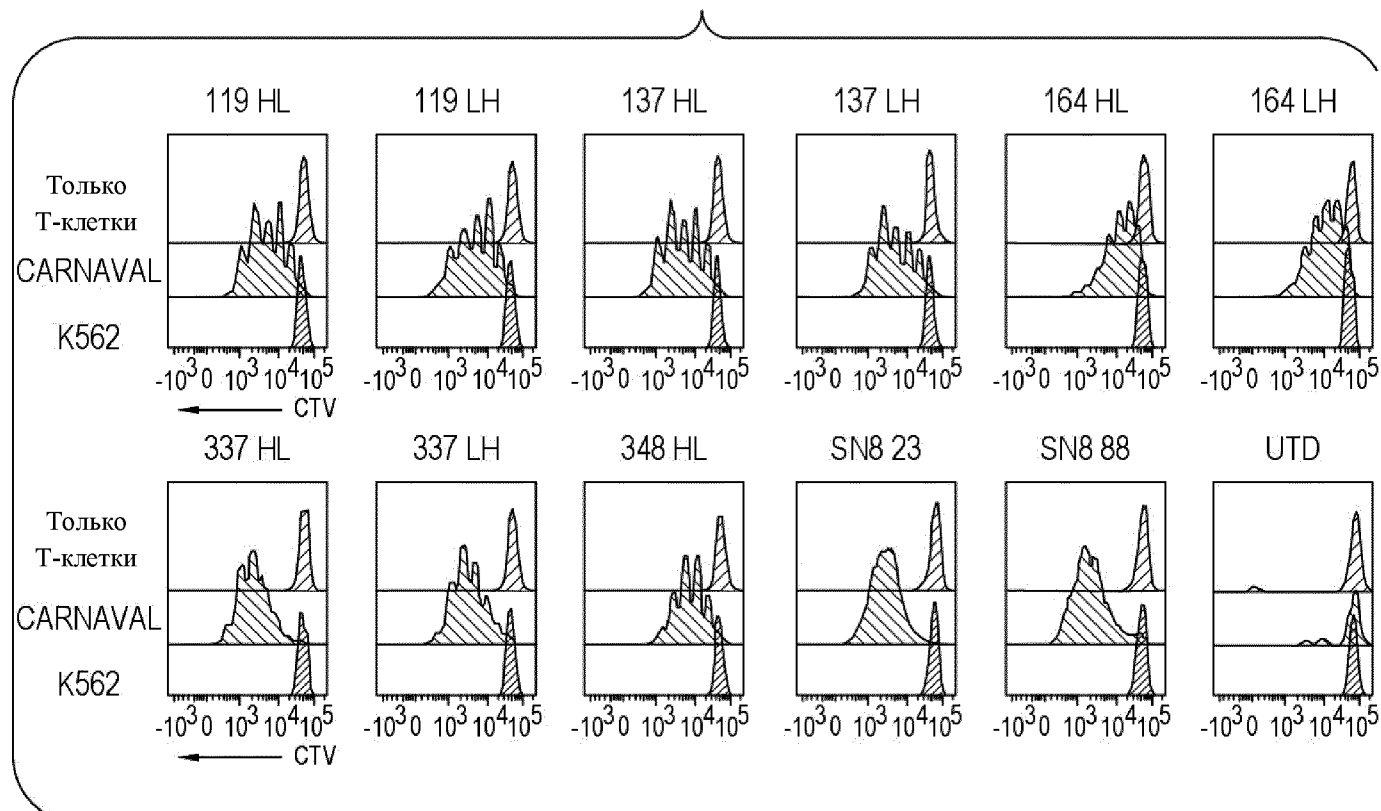
Фиг. 4D



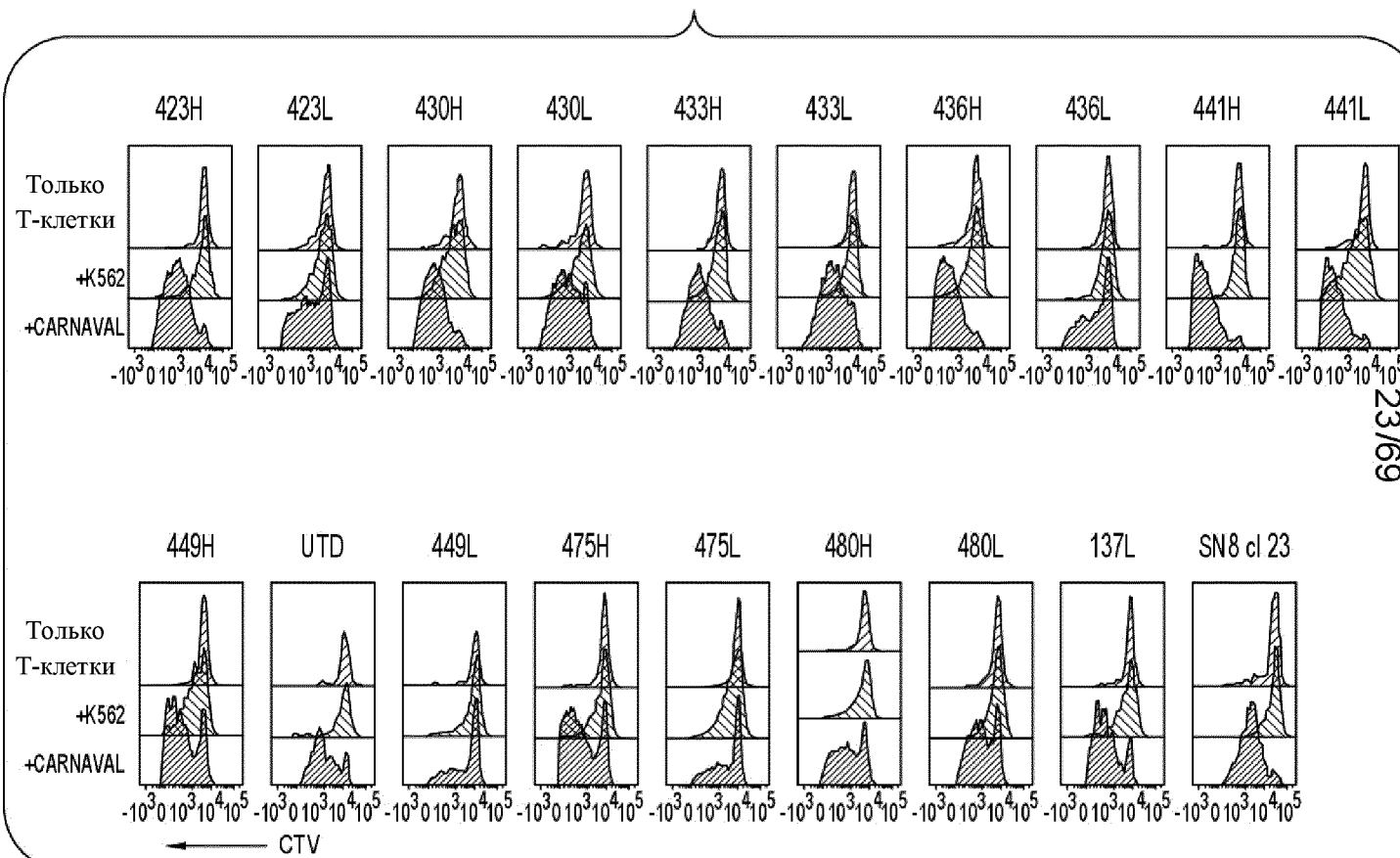
ФИГ. 5А



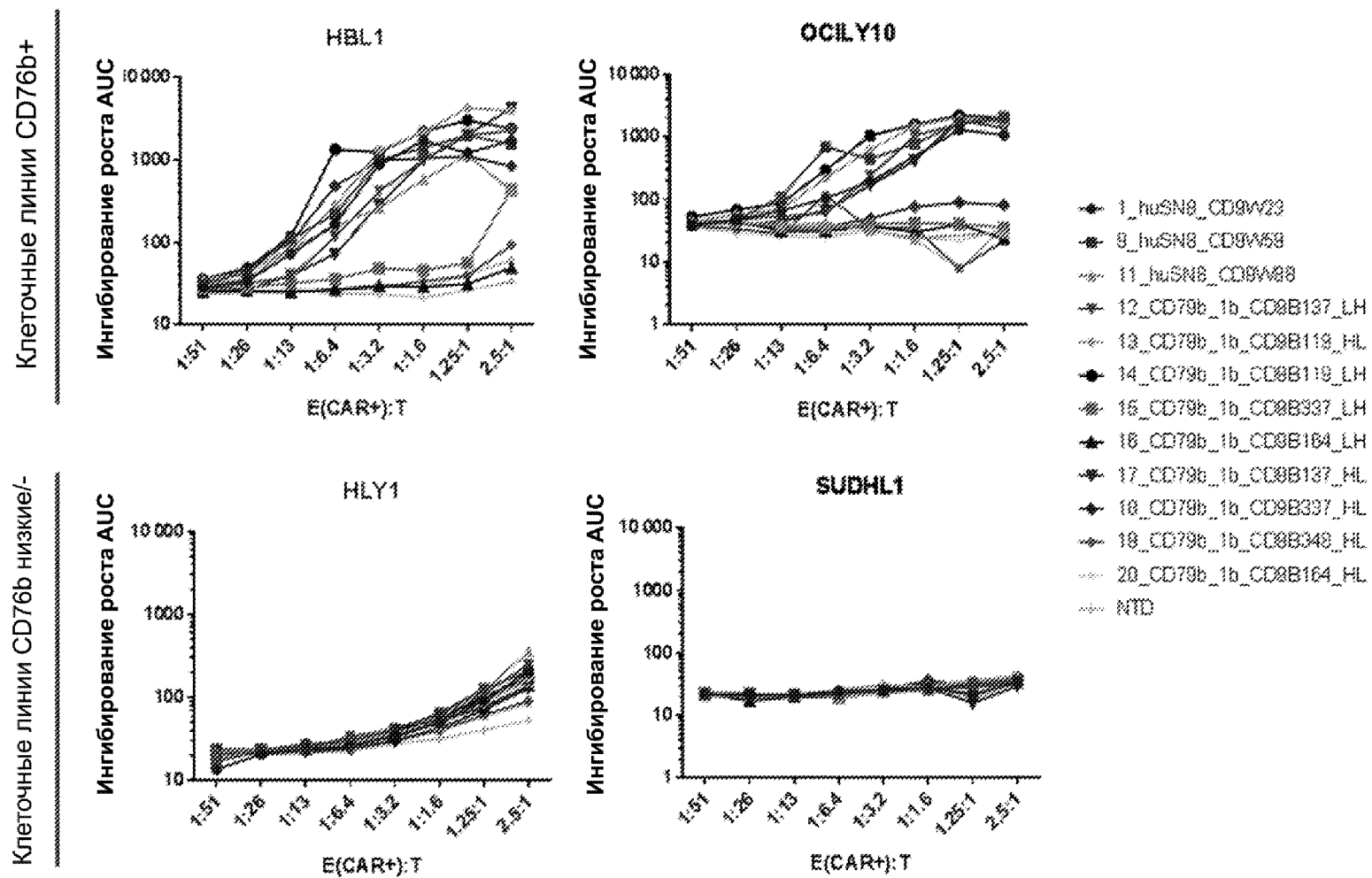
Фиг. 5В

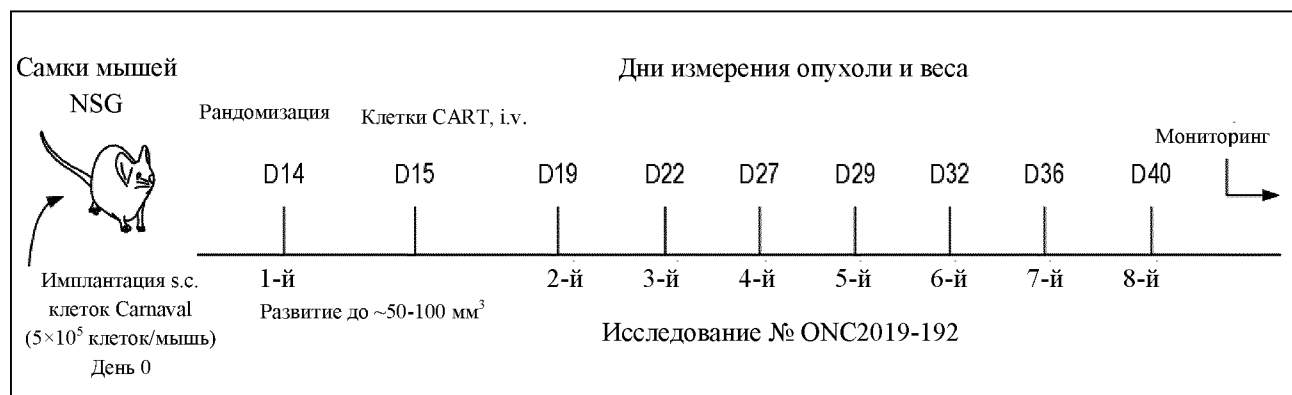


Фиг. 5С



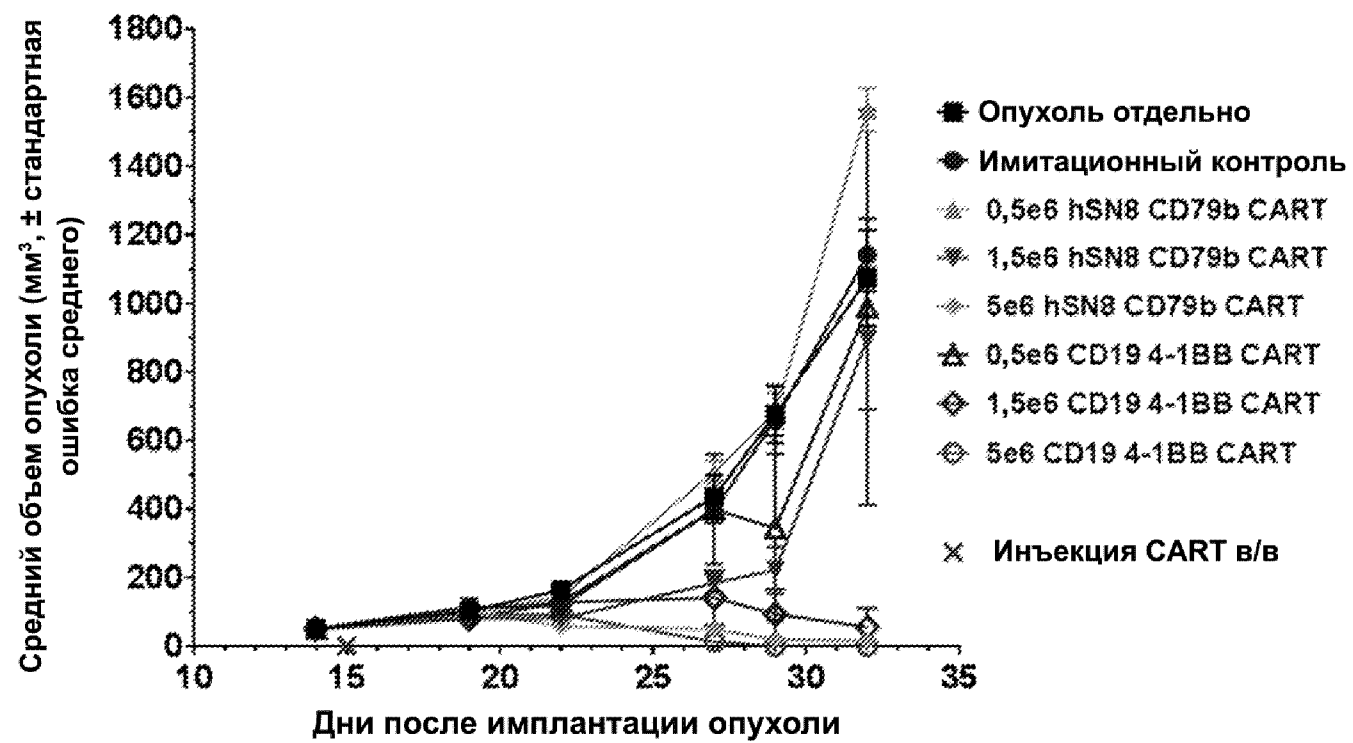
Фиг. 6



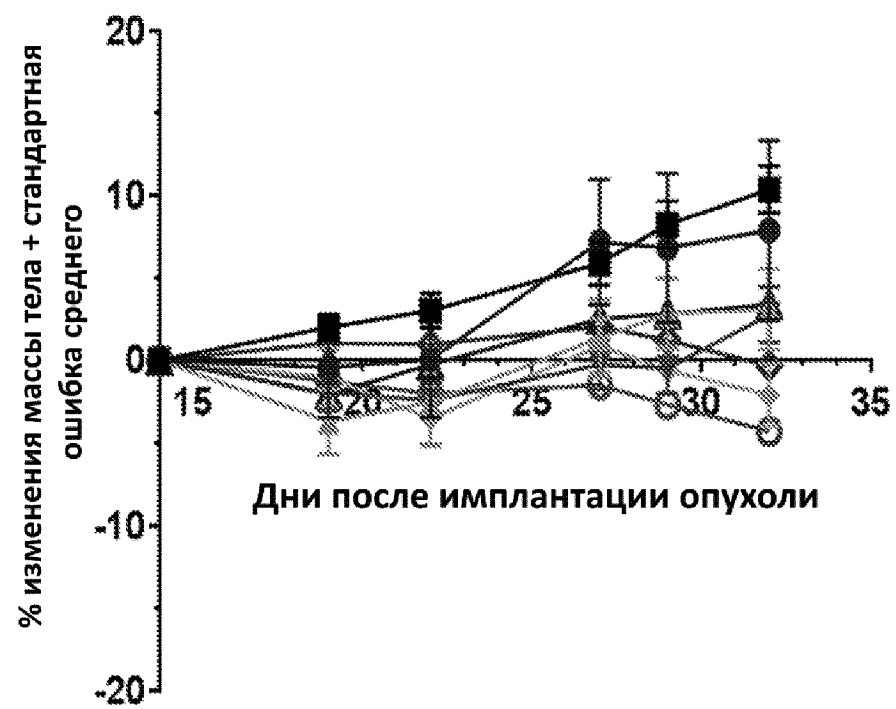


Фиг. 7А

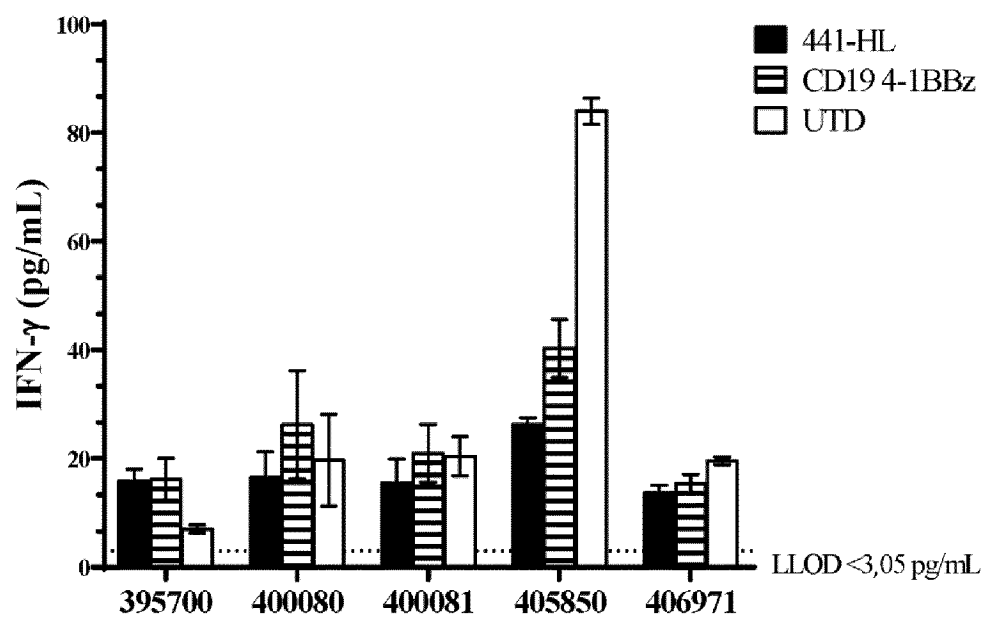
Фиг. 7В



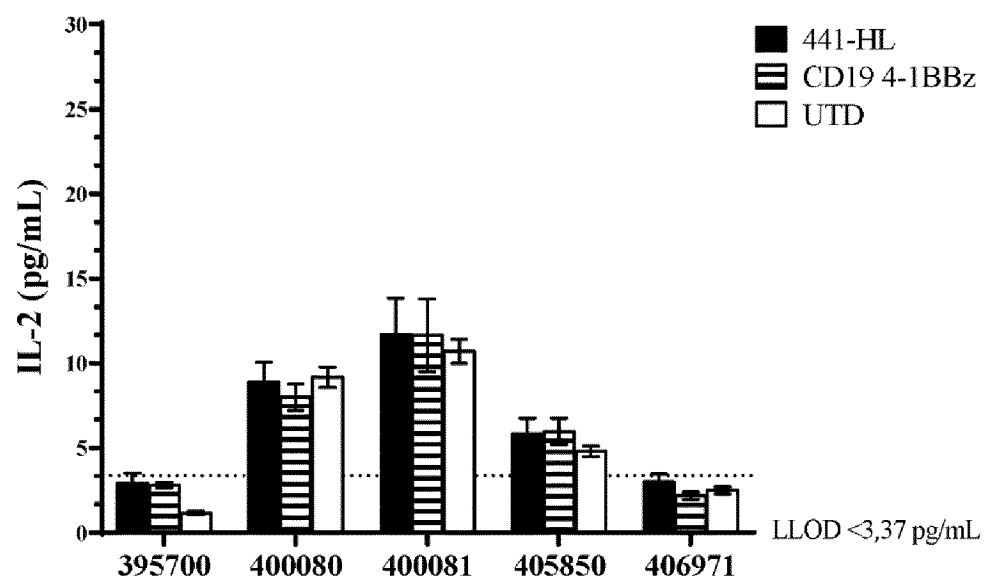
Фиг. 7С



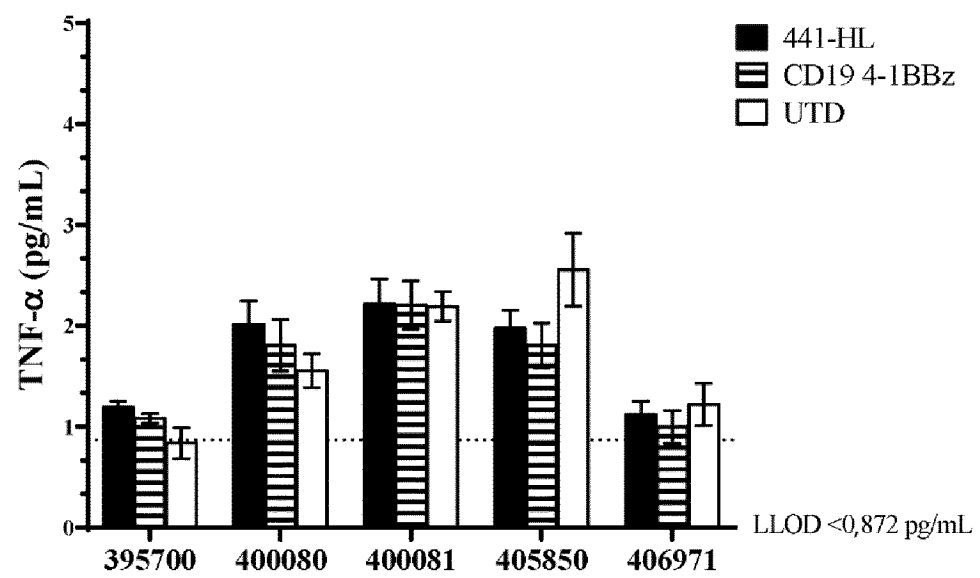
ФИГ. 8А



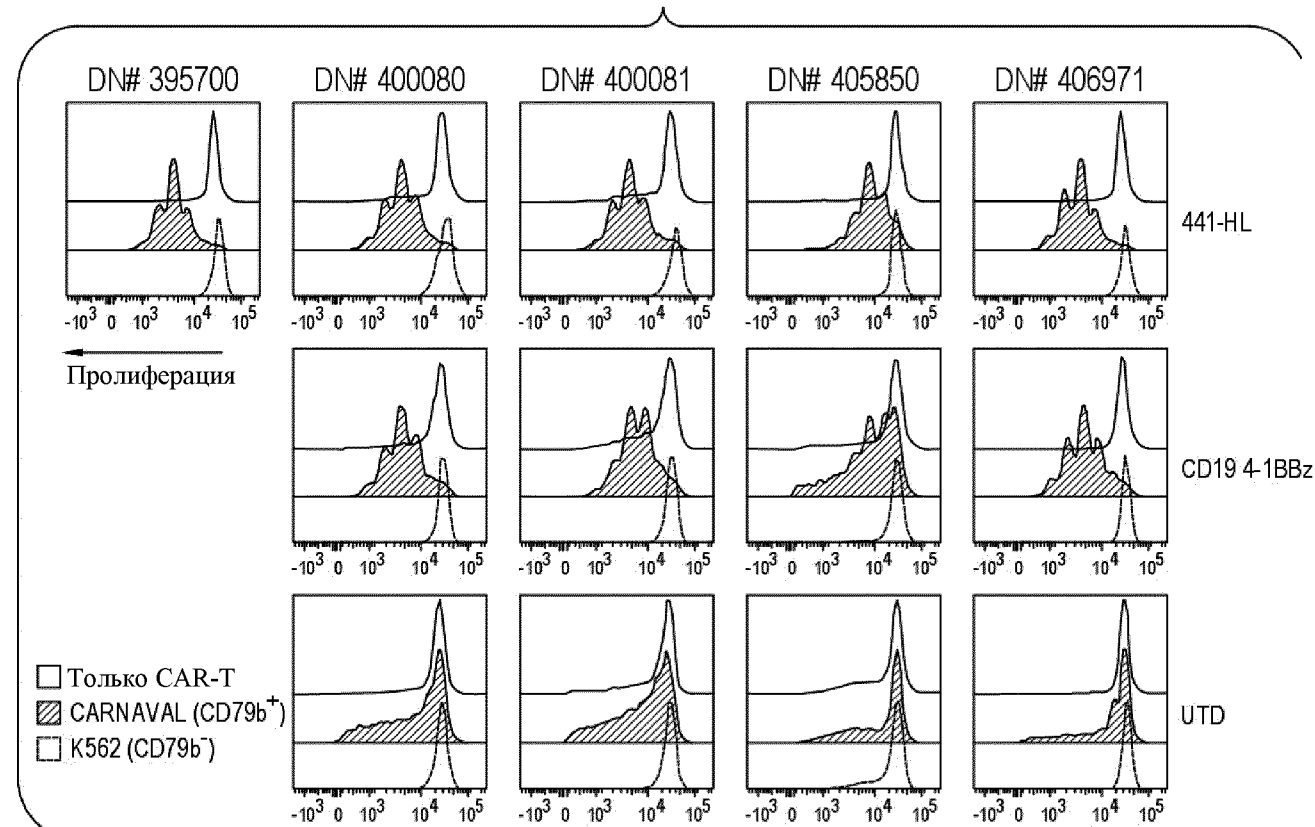
Фиг. 8В



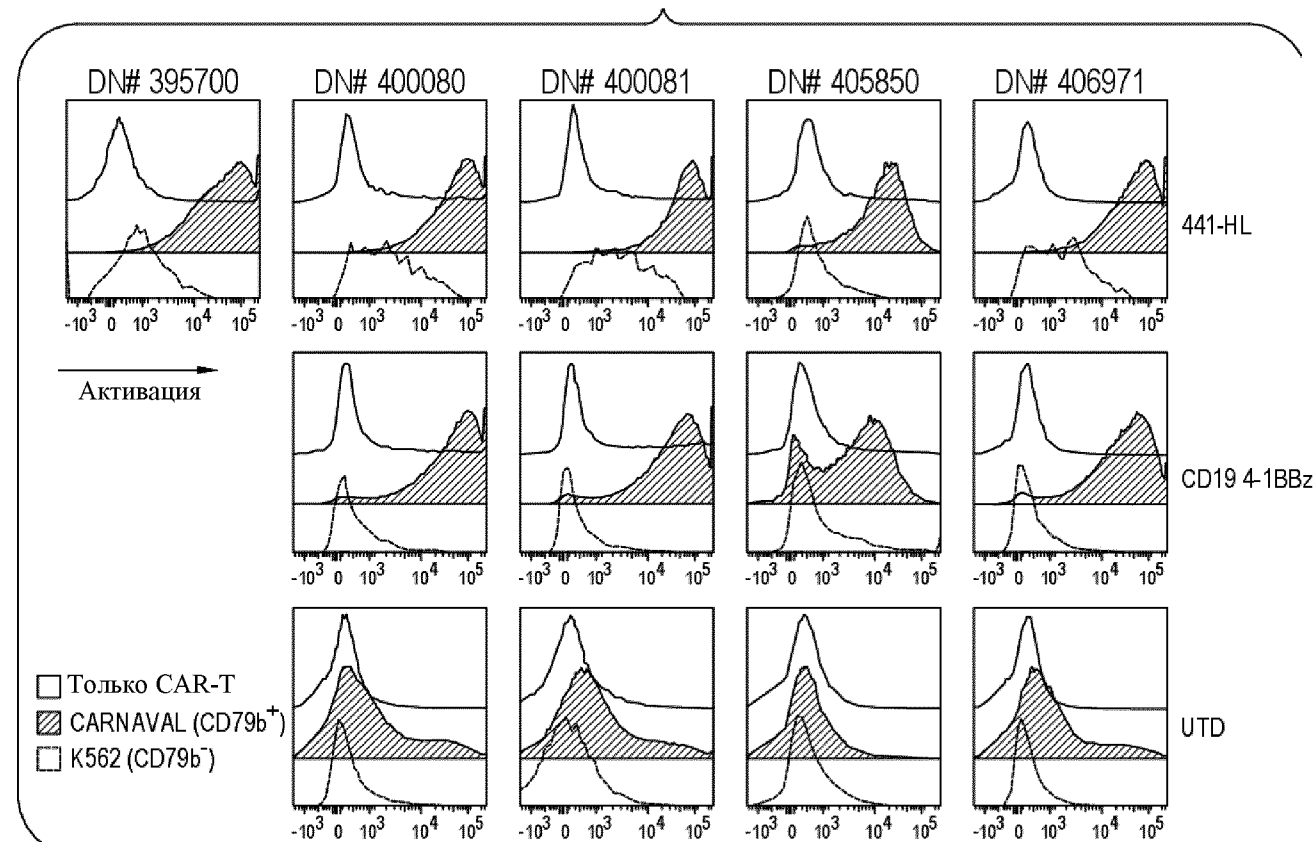
Фиг. 8С



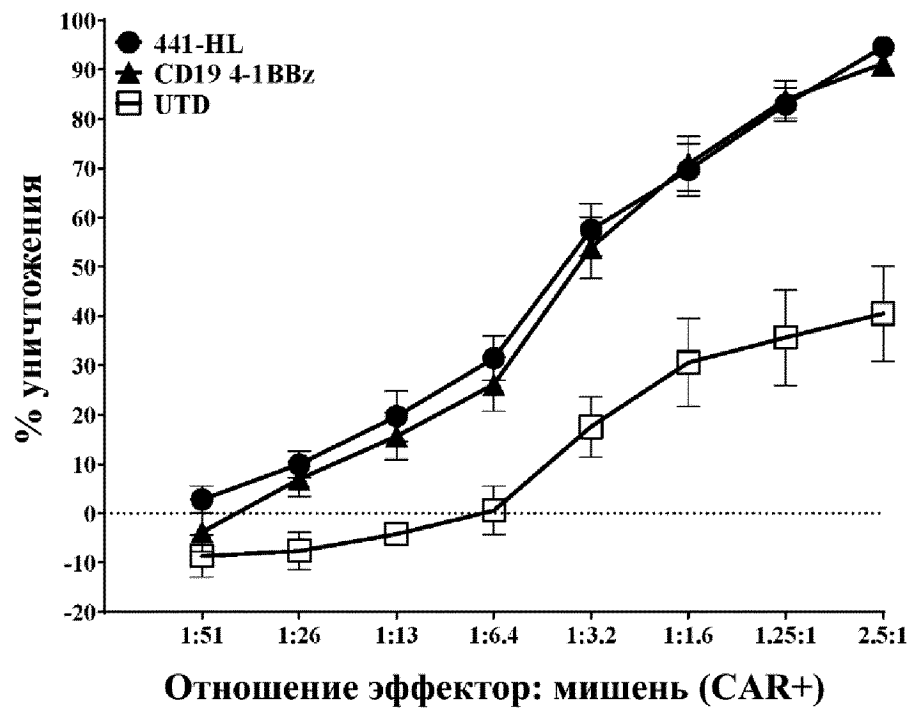
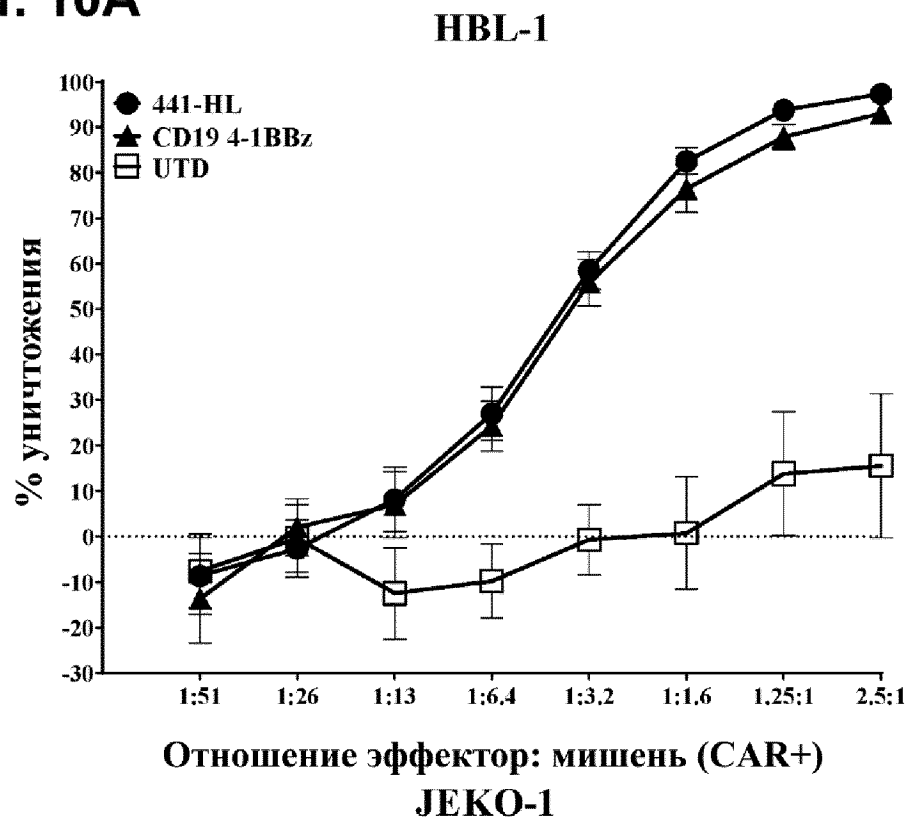
Фиг. 9А



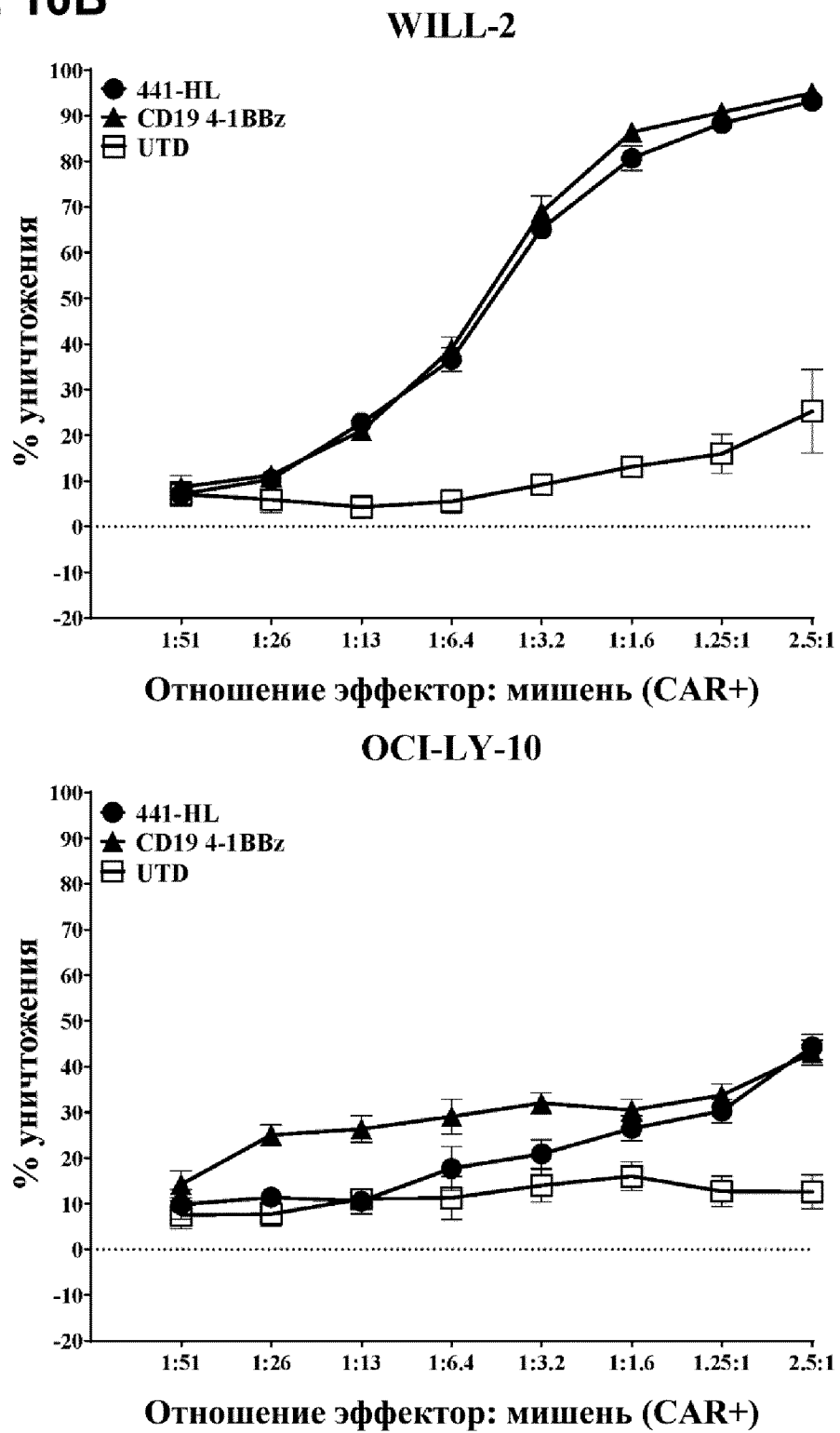
Фиг. 9В



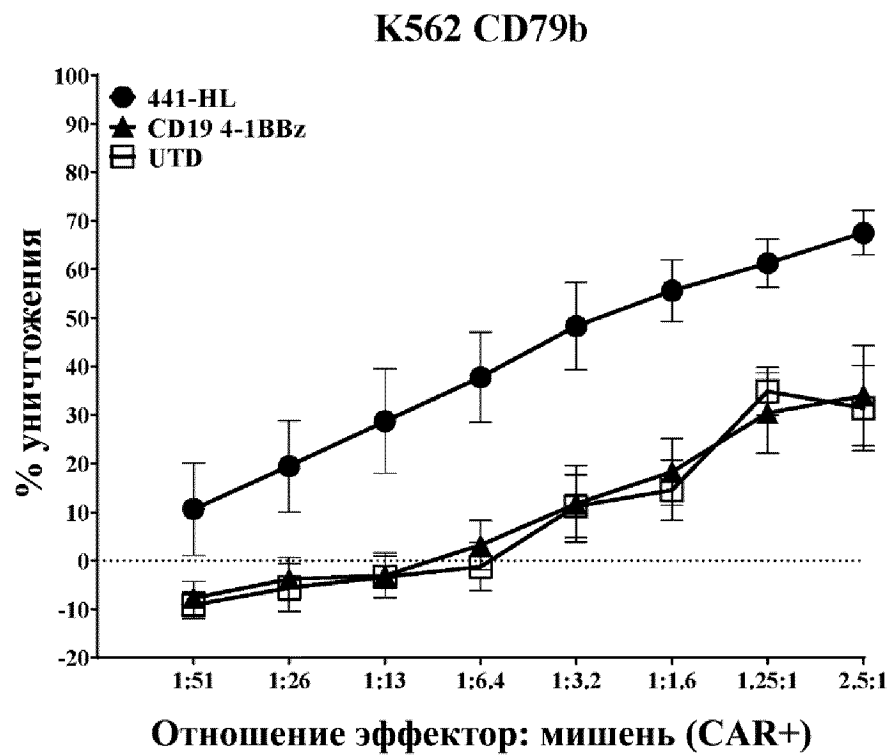
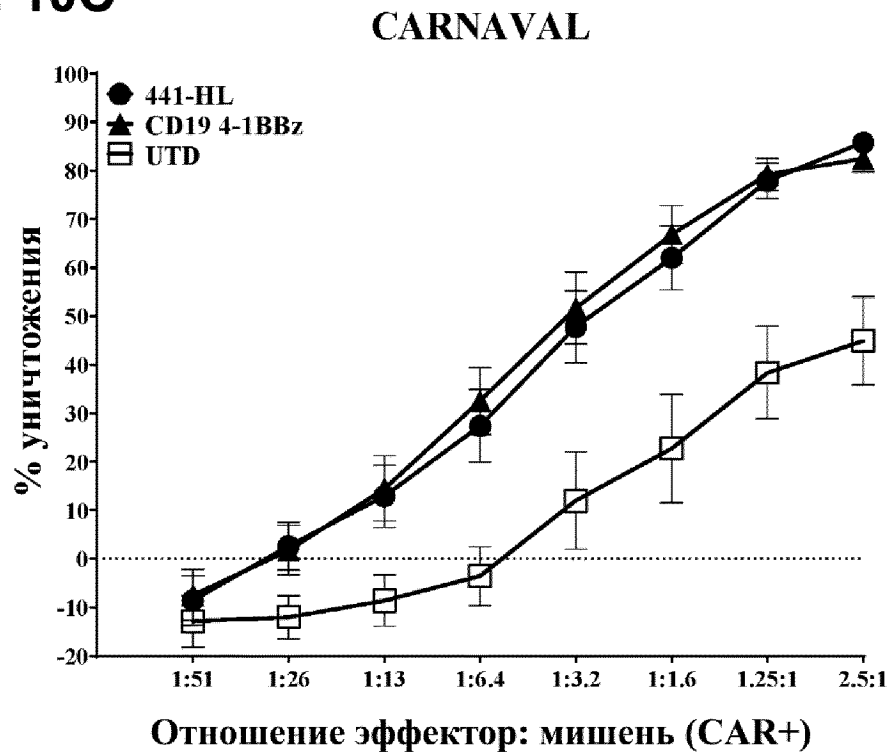
Фиг. 10А



Фиг. 10В

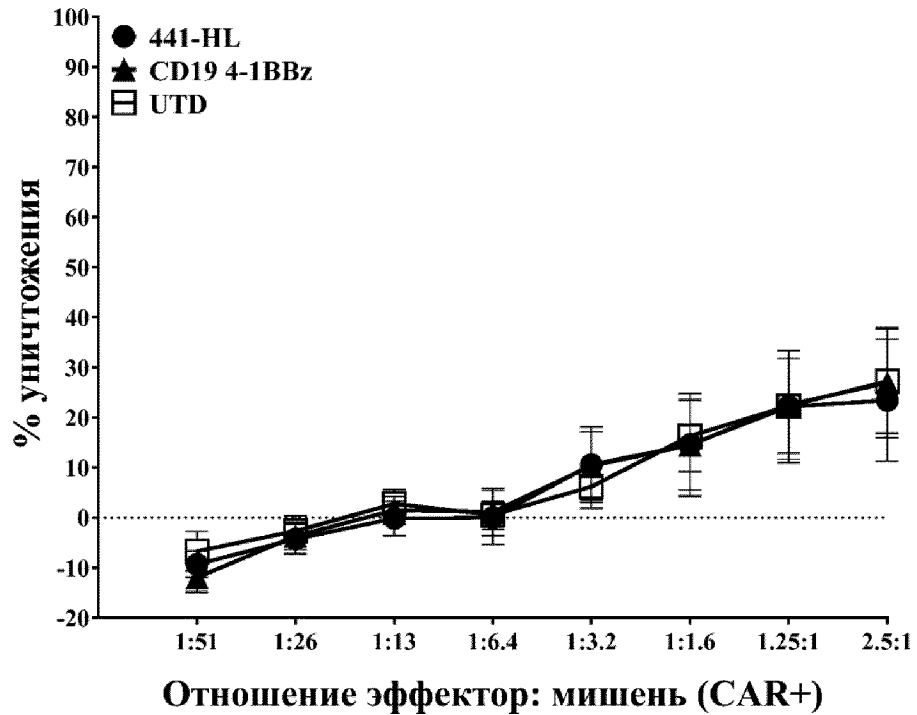


Фиг. 10С

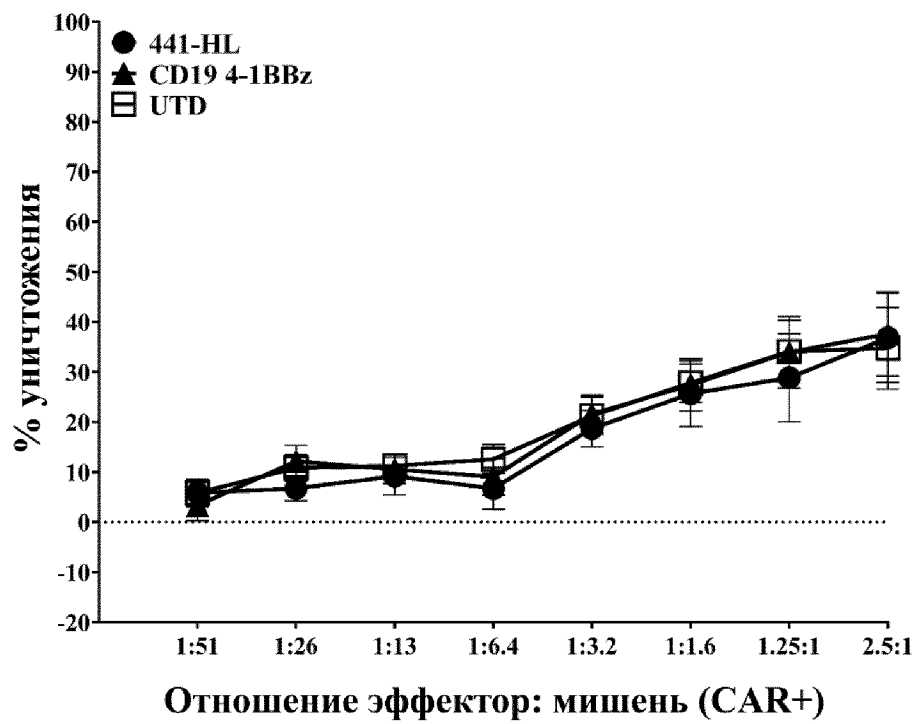


Фиг. 10D

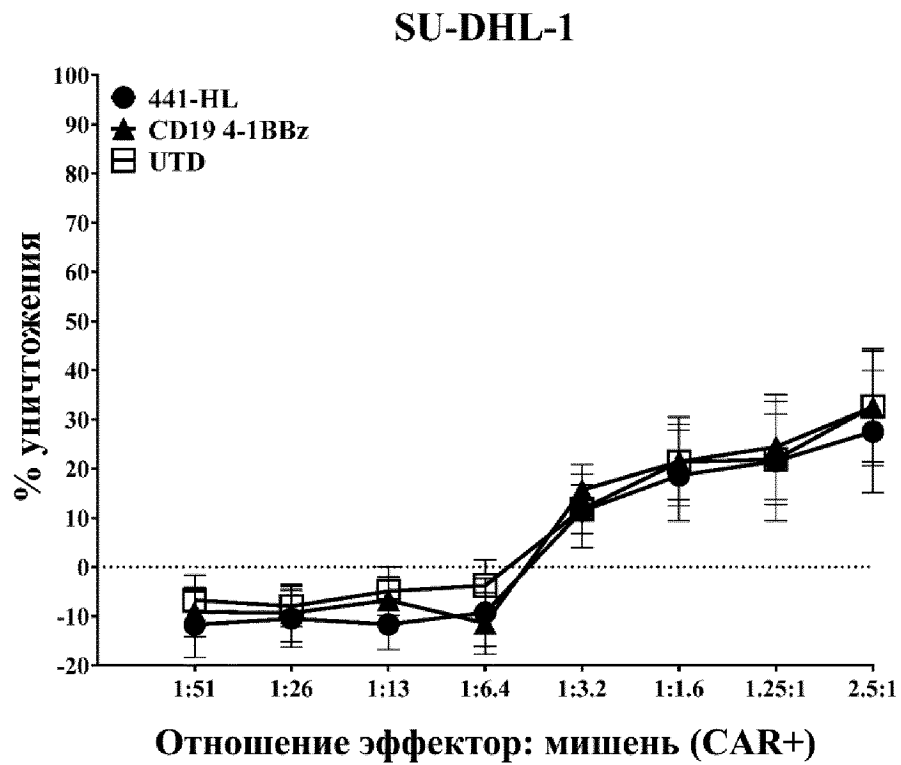
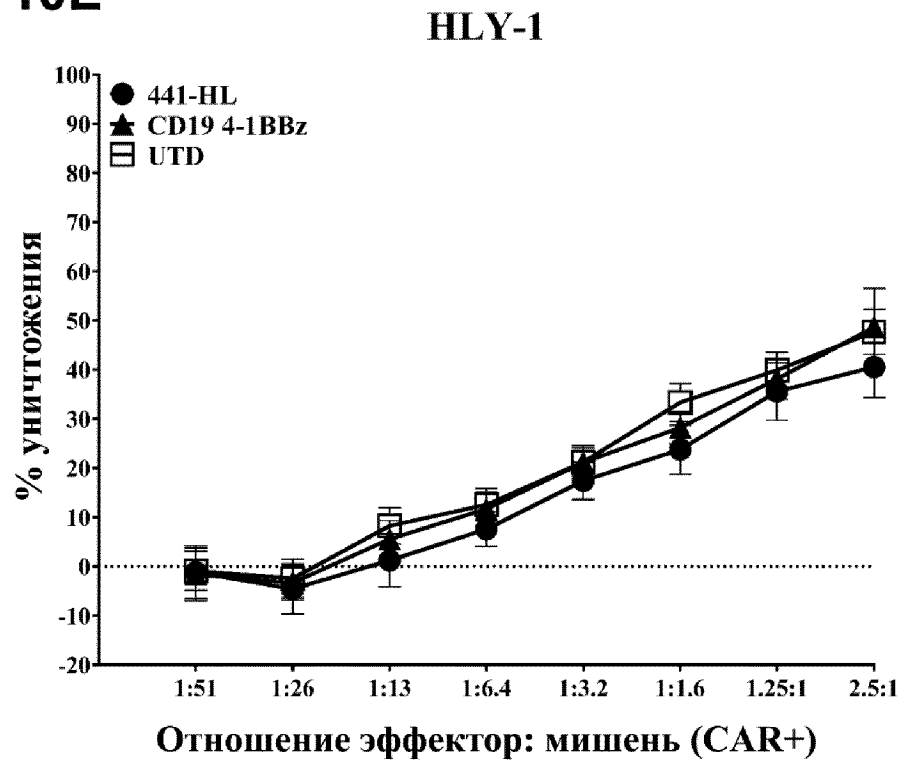
HL-60



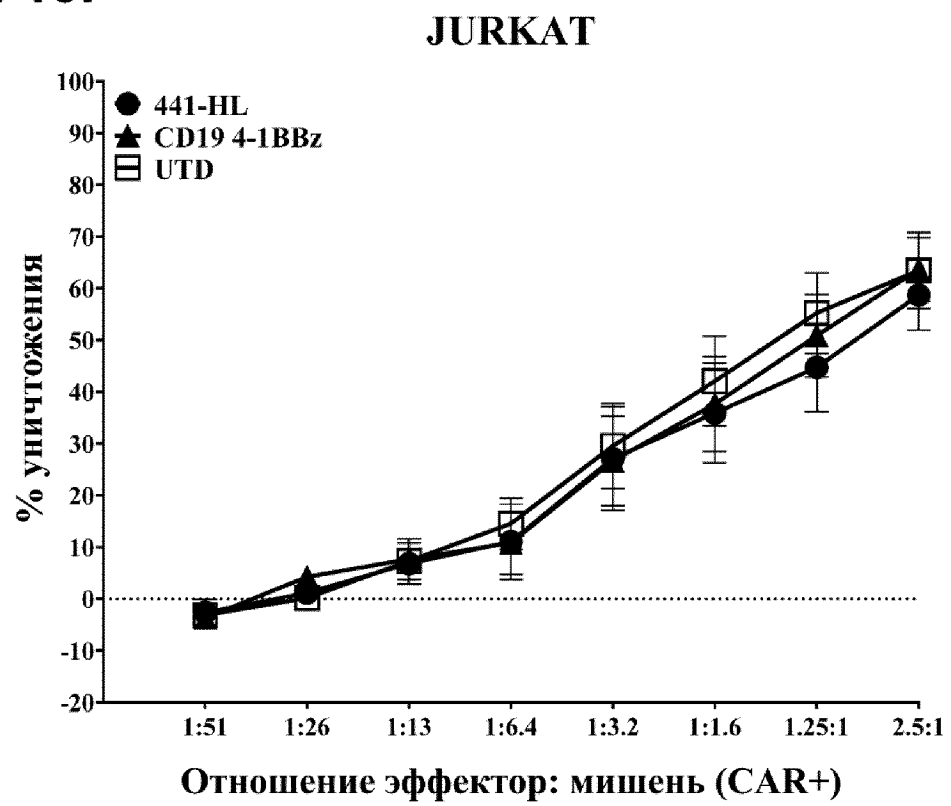
K562

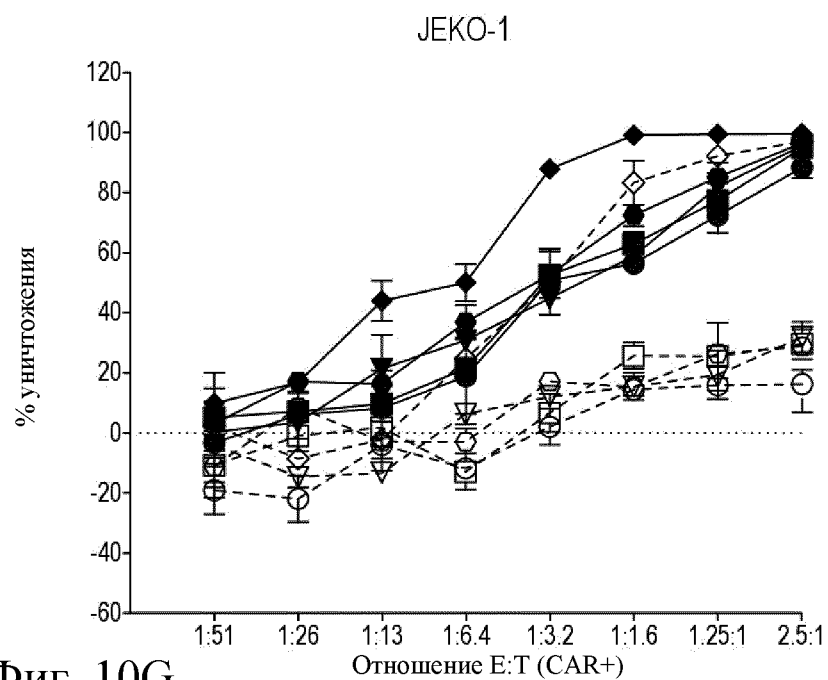
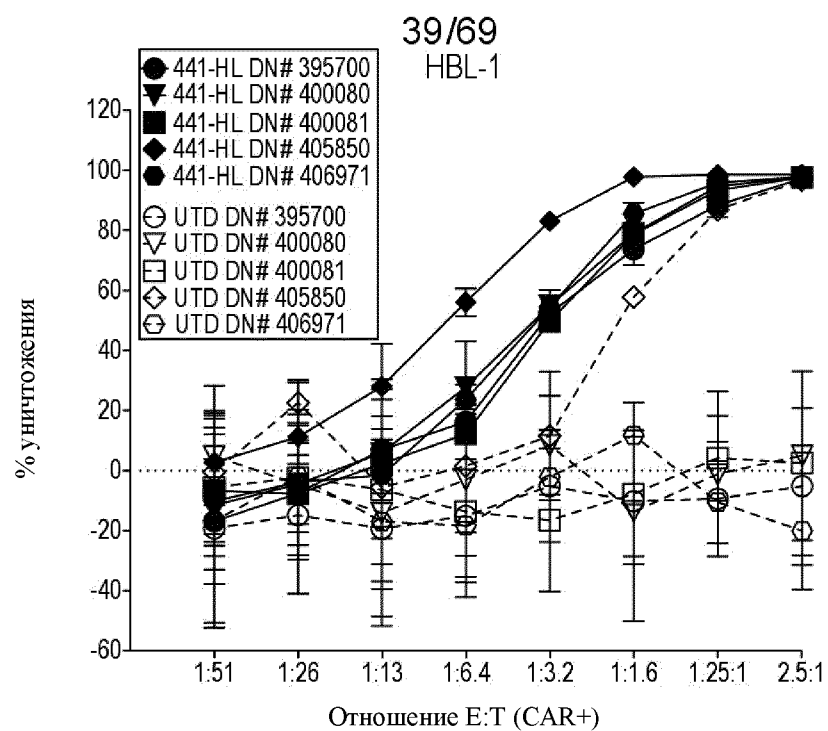


Фиг. 10Е

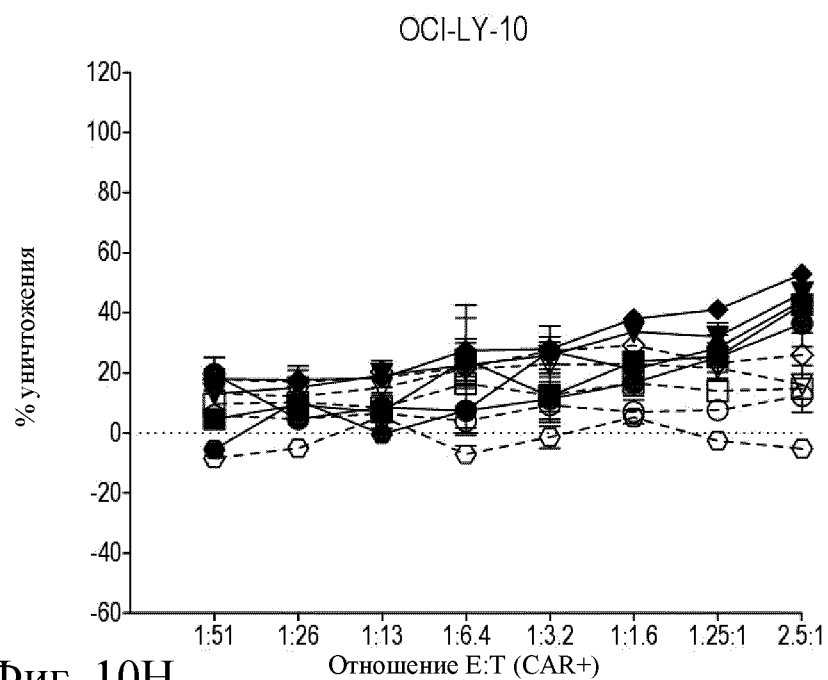
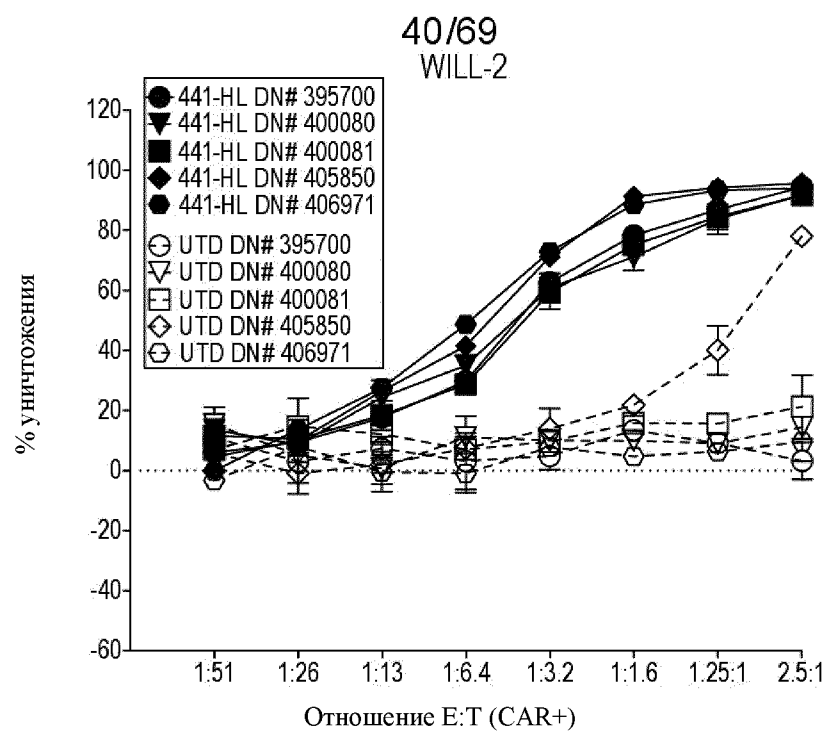


Фиг. 10F

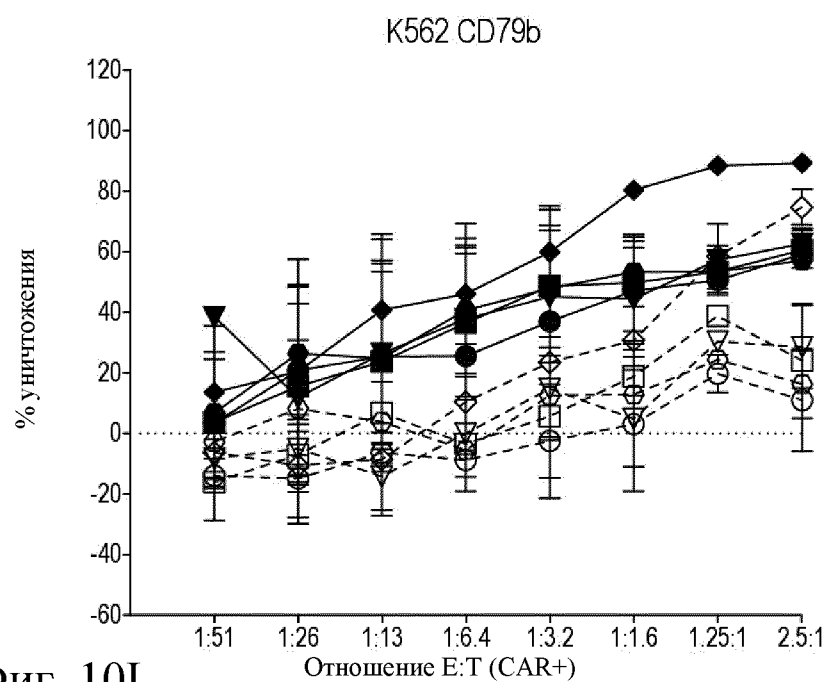
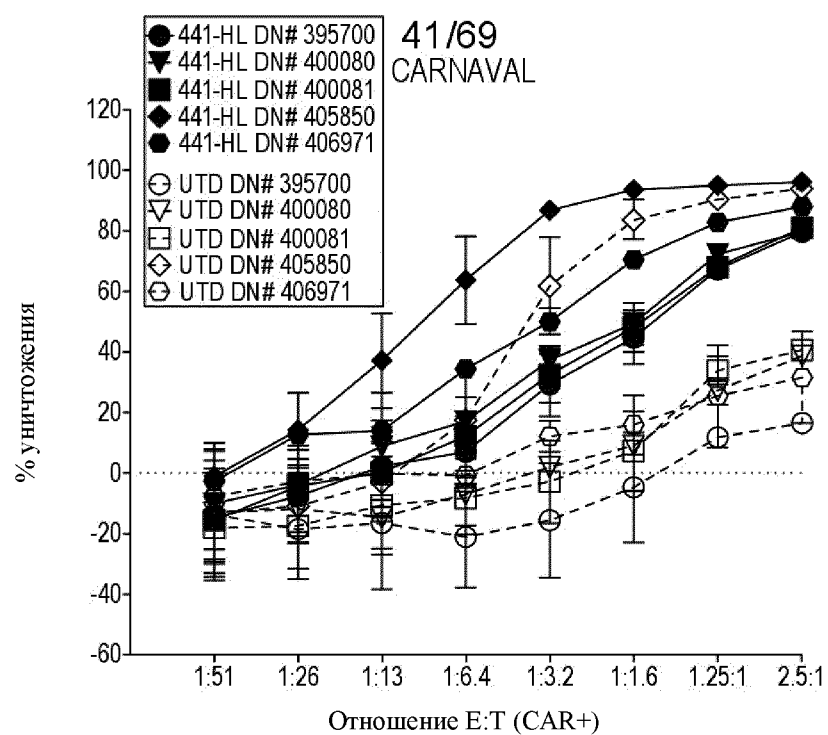




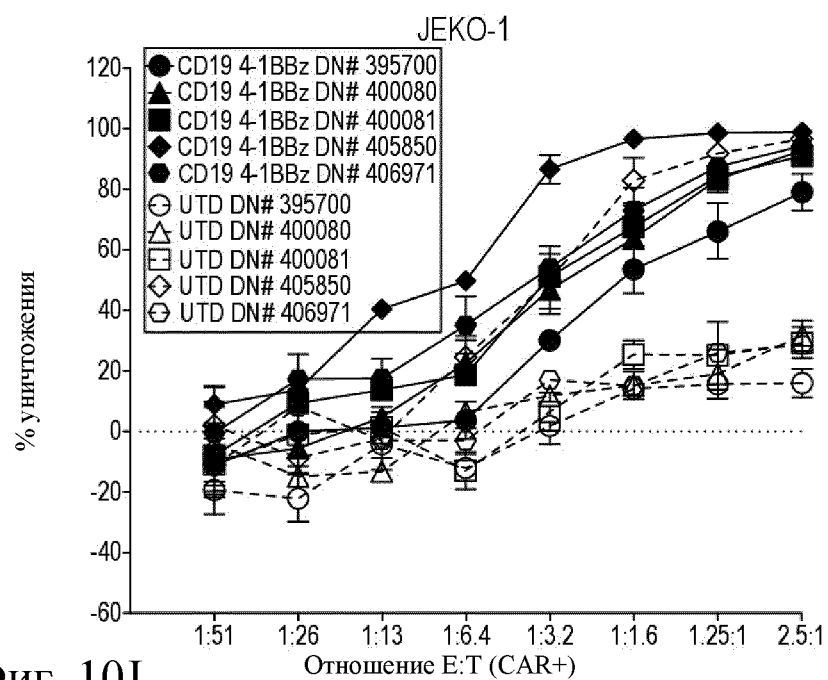
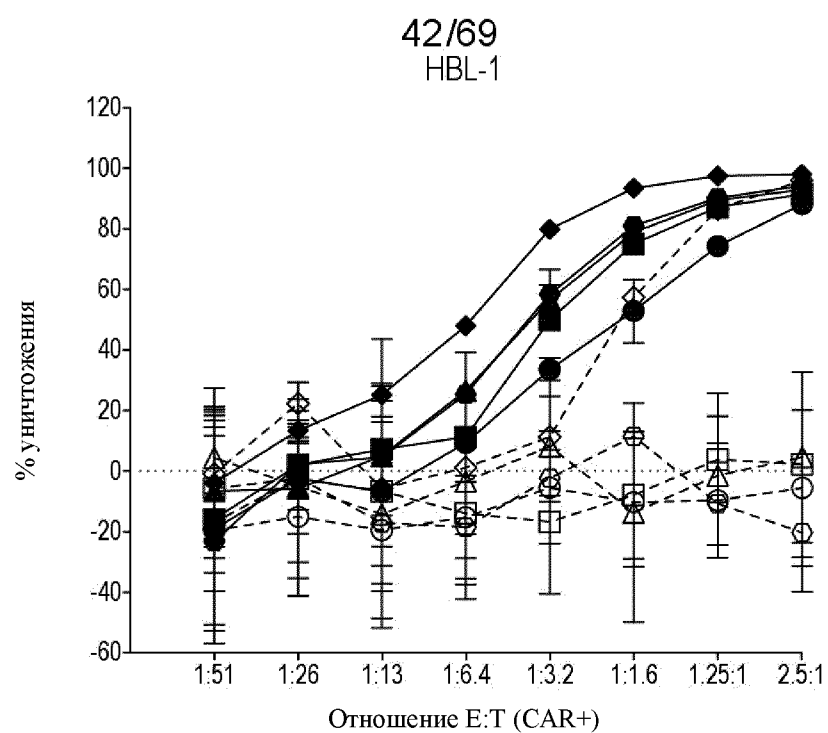
Фиг. 10G



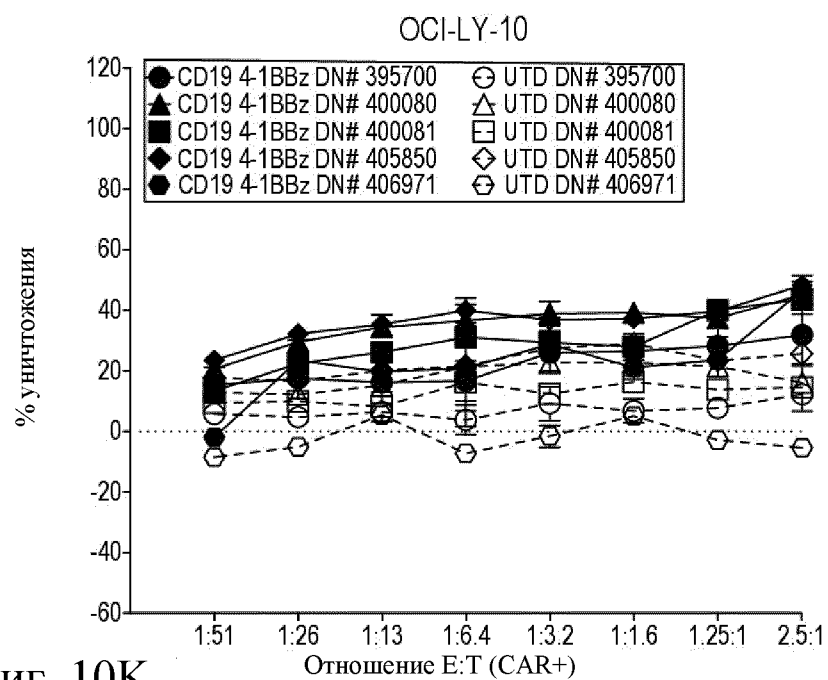
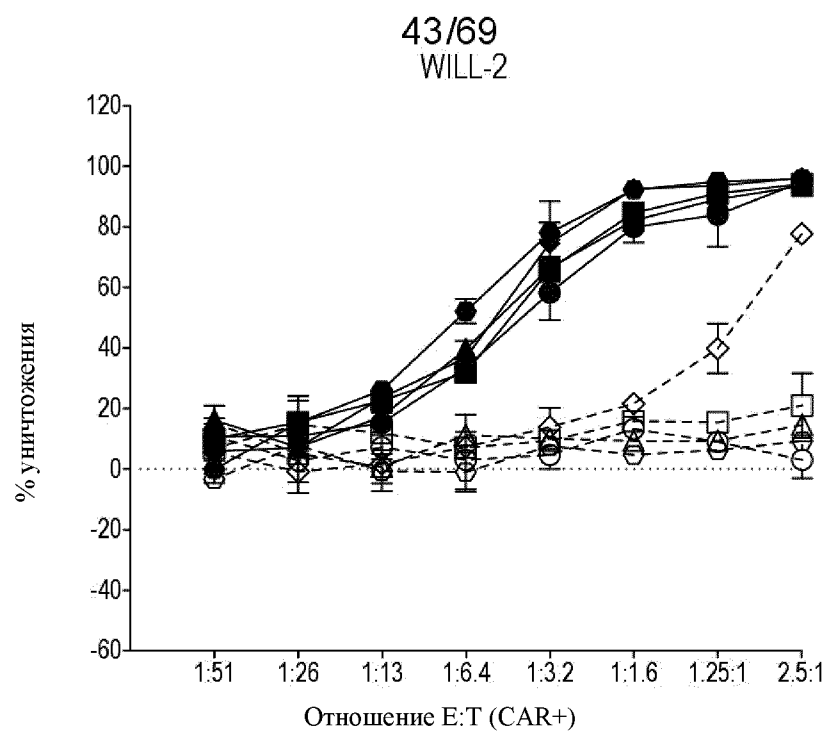
Фиг. 10H



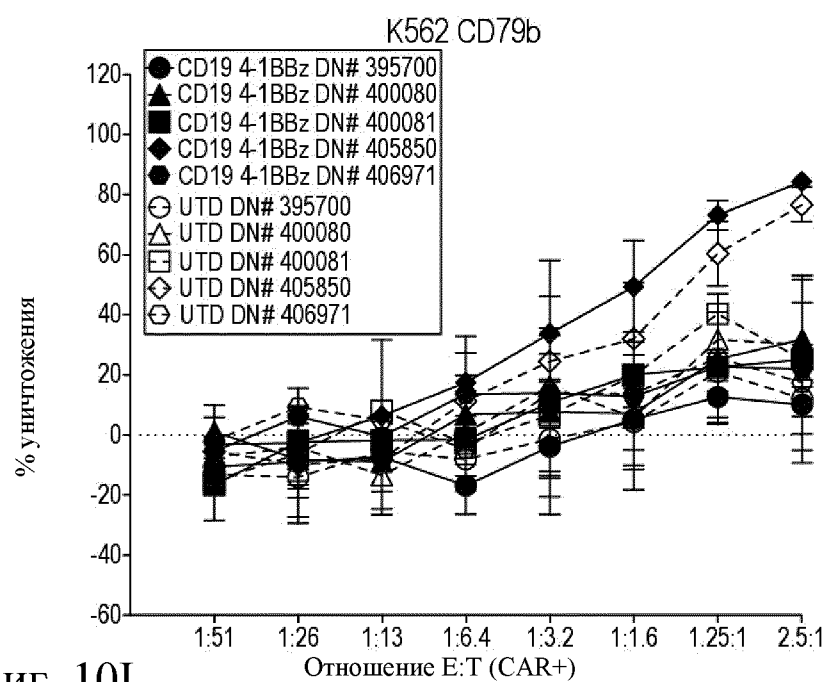
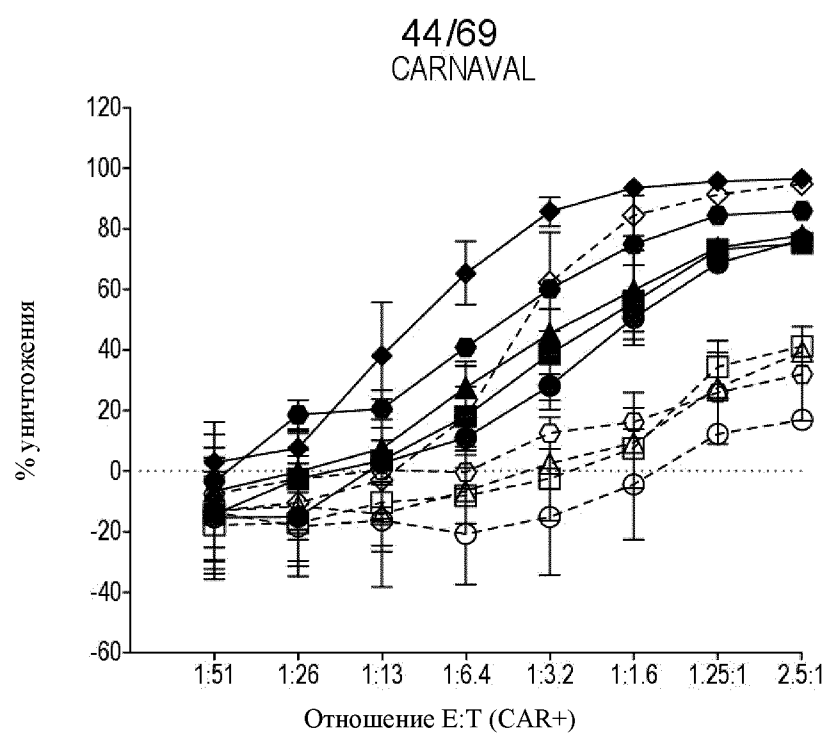
Фиг. 10I



Фиг. 10J



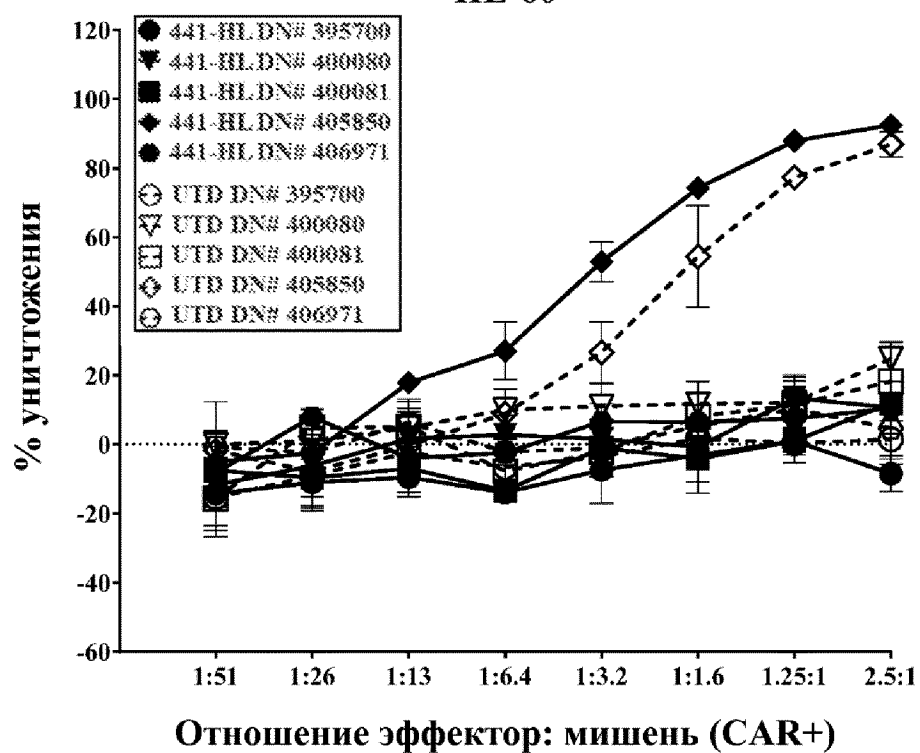
Фиг. 10К



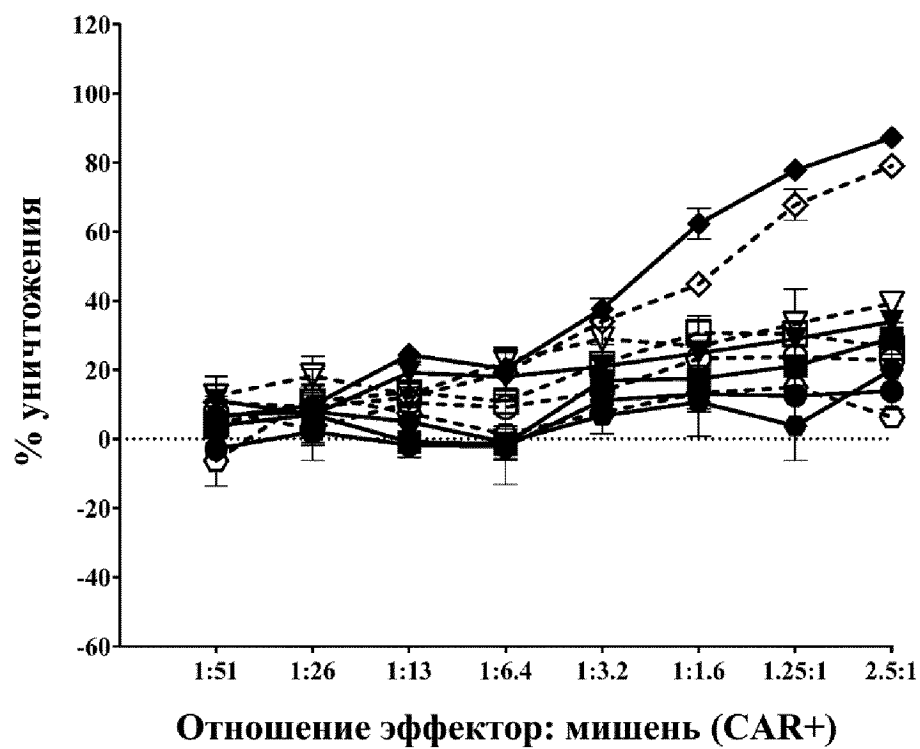
Фиг. 10L

Фиг. 10М

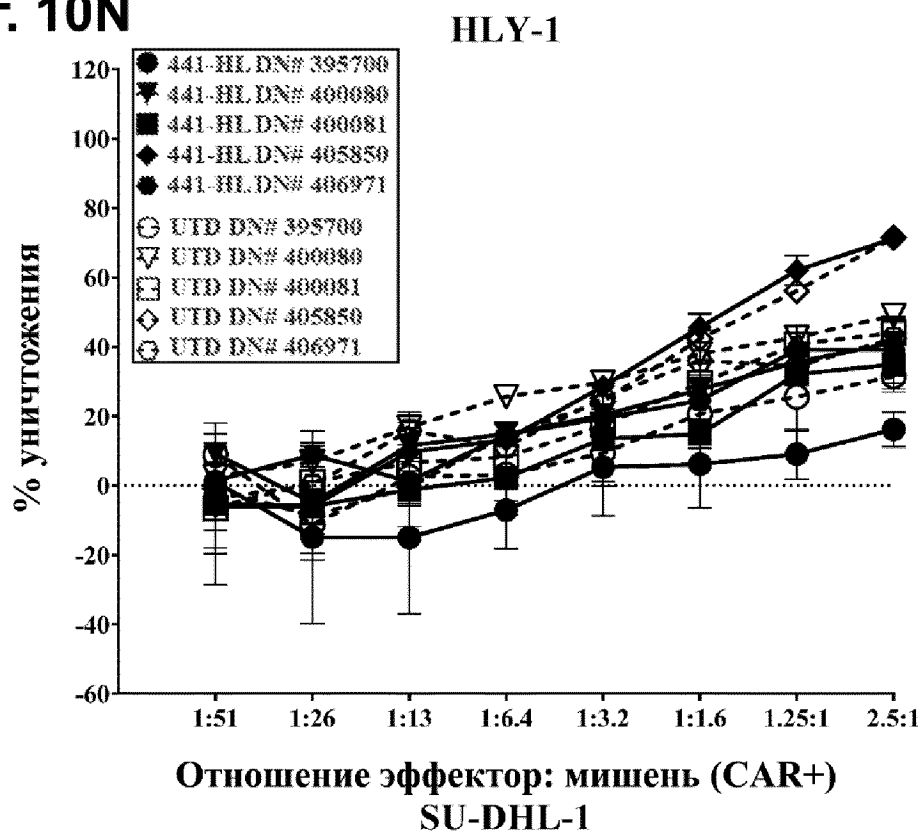
HL-60



K562

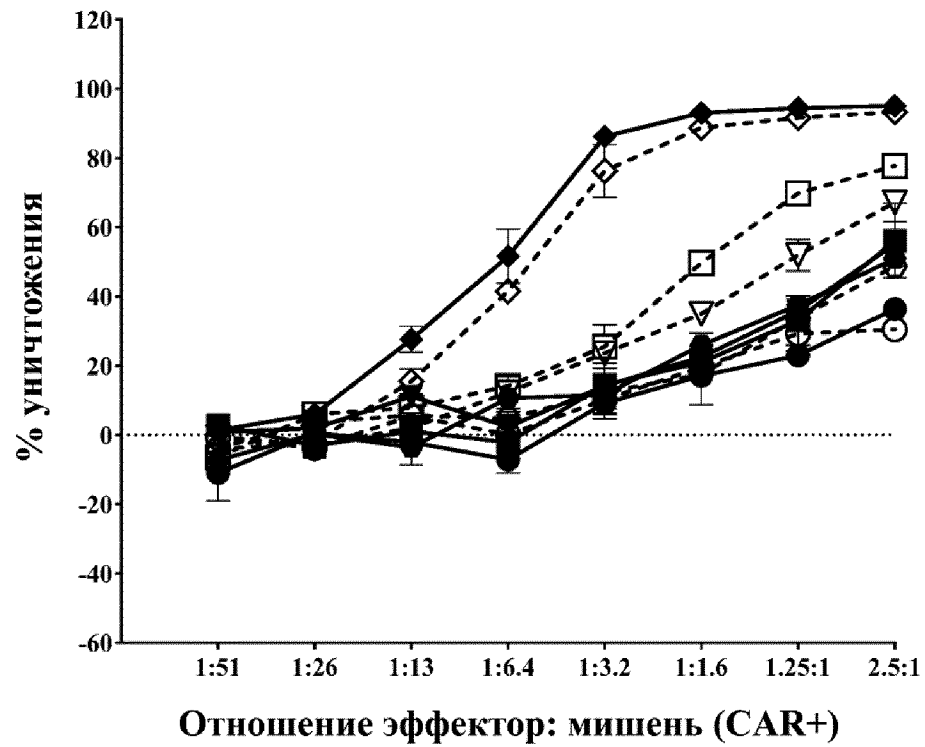


Фиг. 10N



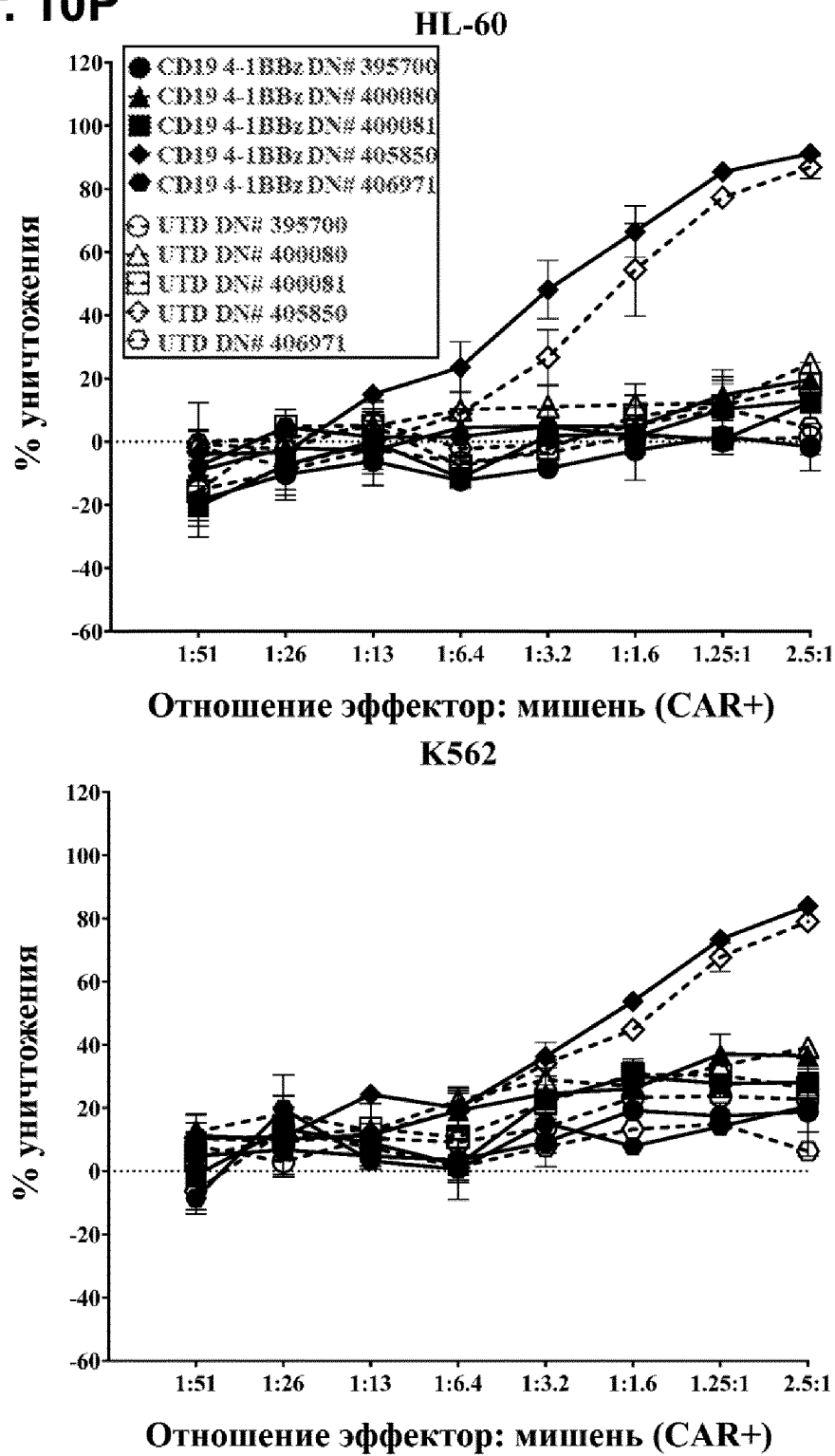
Фиг. 100

JURKAT



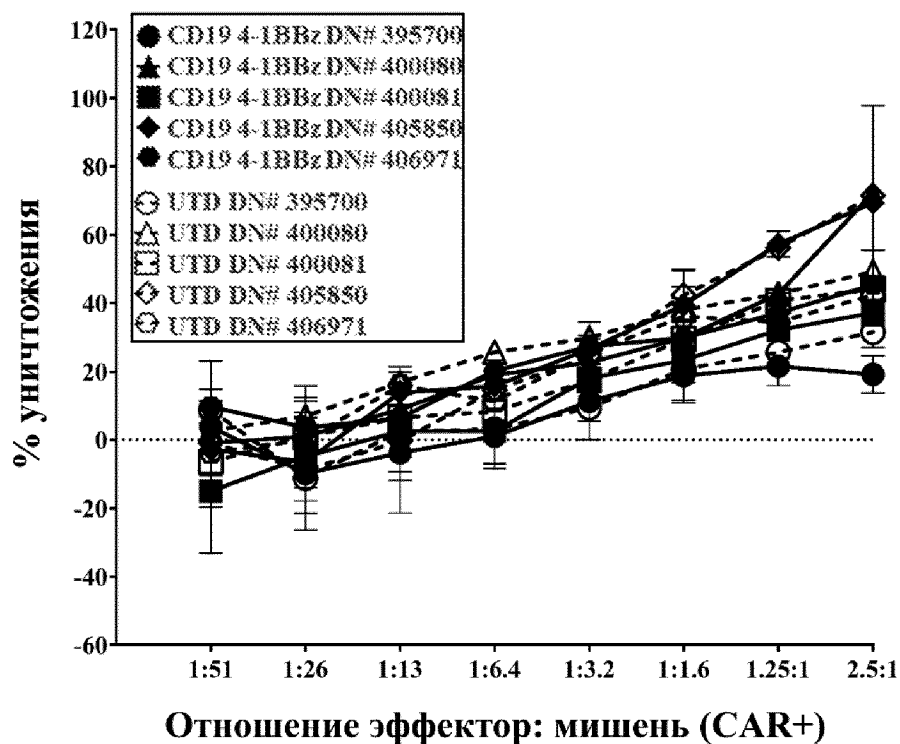
- 441-HL DN# 395700
- ▼ 441-HL DN# 400080
- 441-HL DN# 400081
- ◆ 441-HL DN# 405850
- 441-HL DN# 406971
- UTD DN# 395700
- ▽ UTD DN# 400080
- UTD DN# 400081
- ◇ UTD DN# 405850
- UTD DN# 406971

Фиг. 10Р

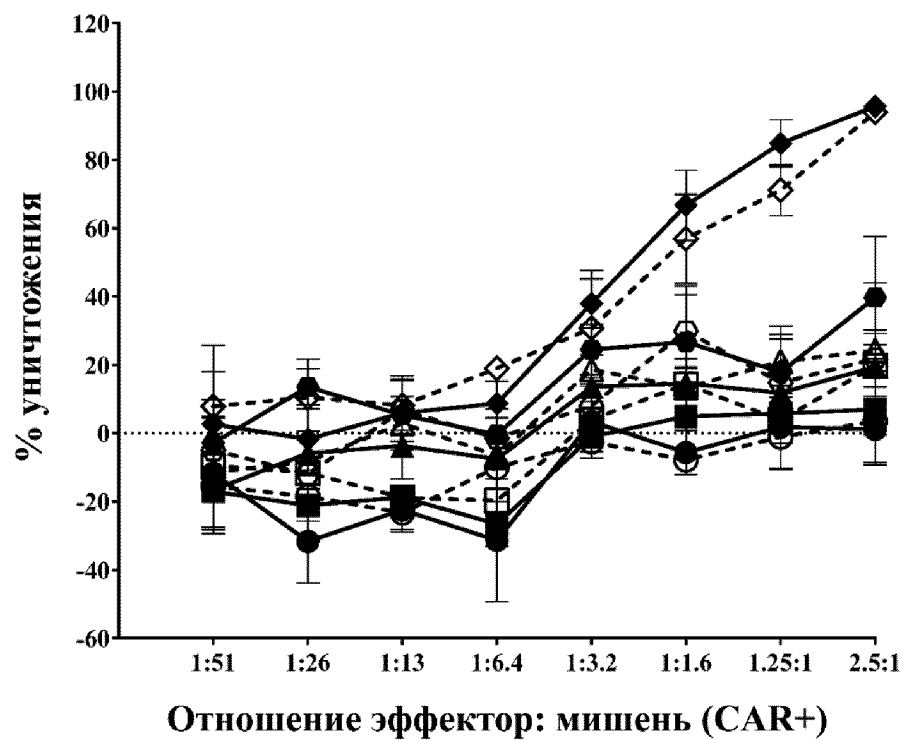


Фиг. 10Q

HLY-1

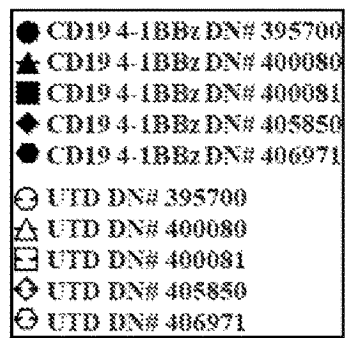
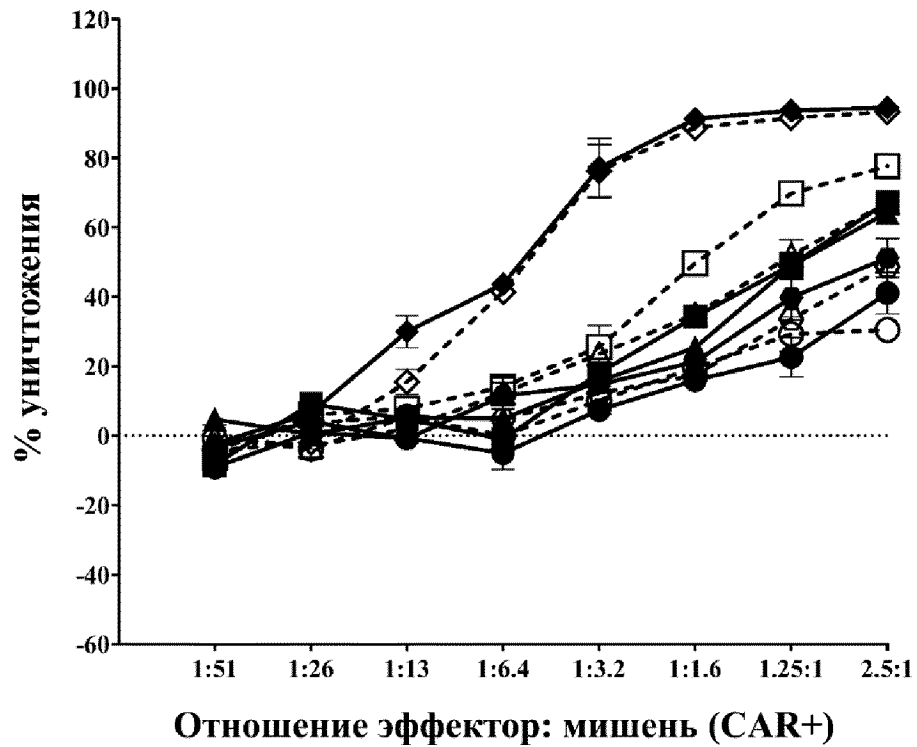


SU-DHL-1

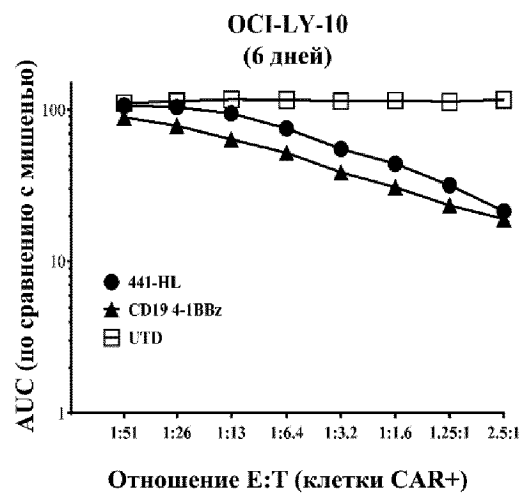
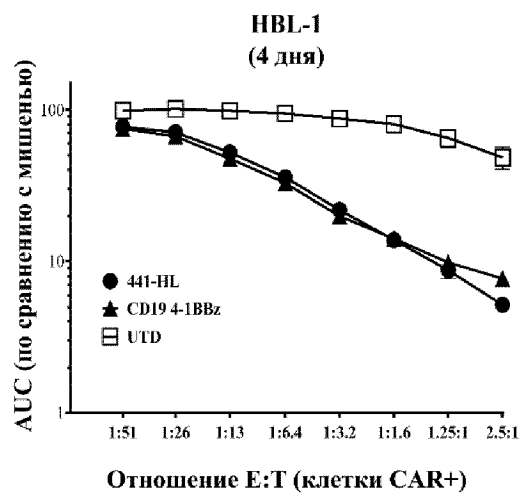


Фиг. 10R

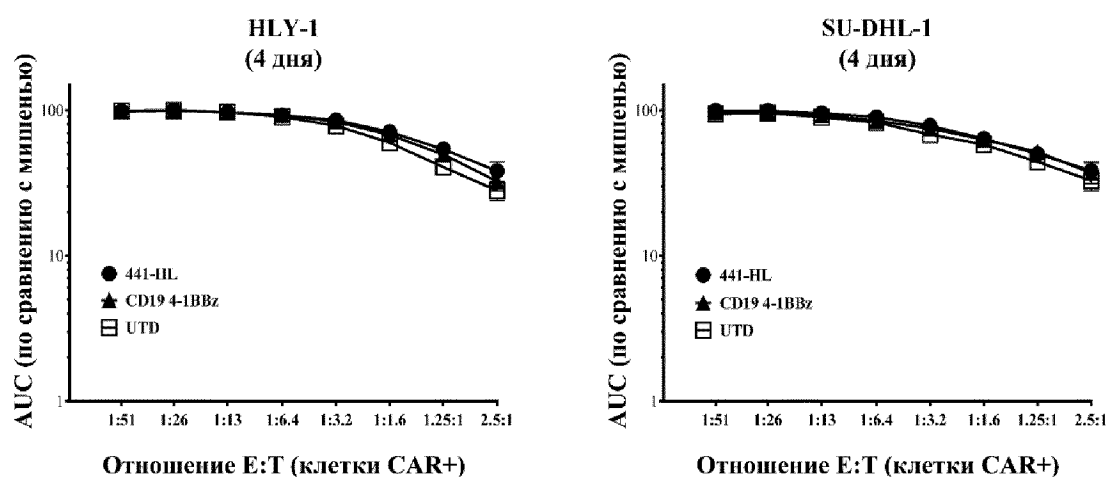
JURKAT



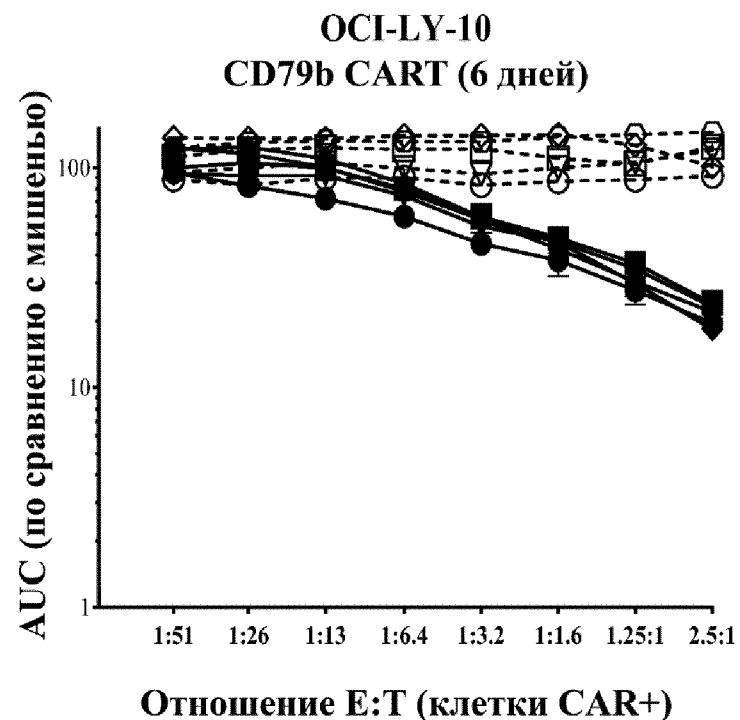
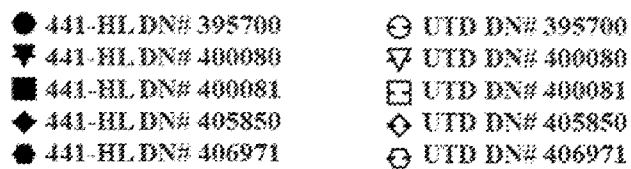
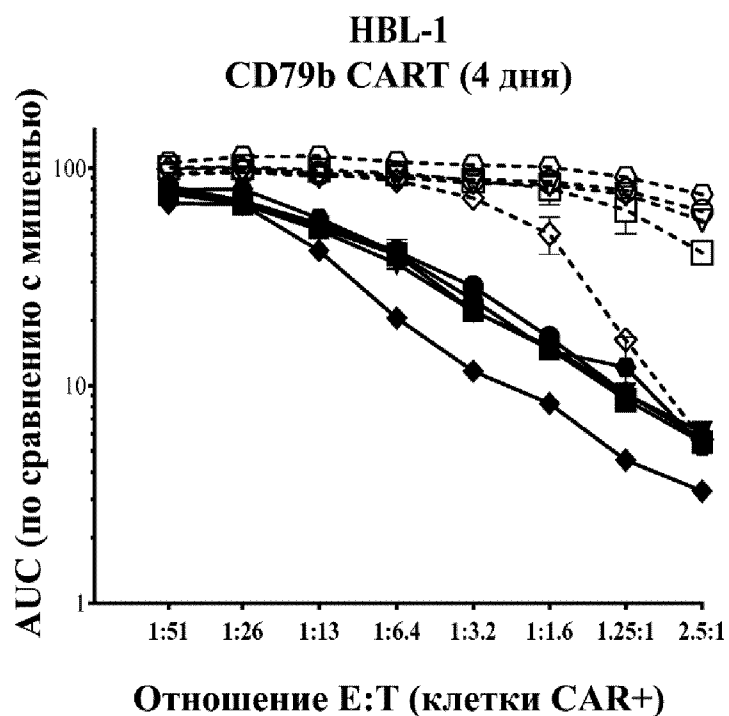
Фиг. 11А



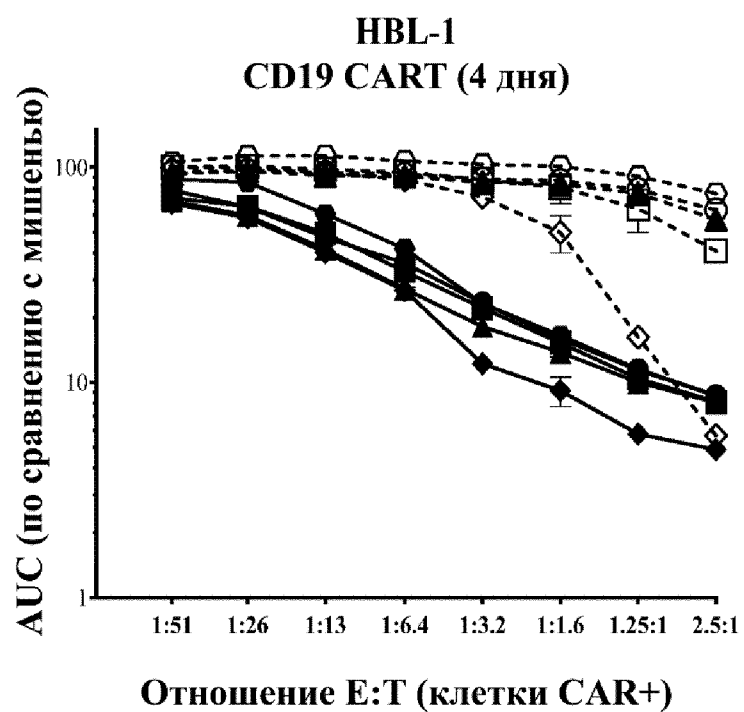
Фиг. 11В



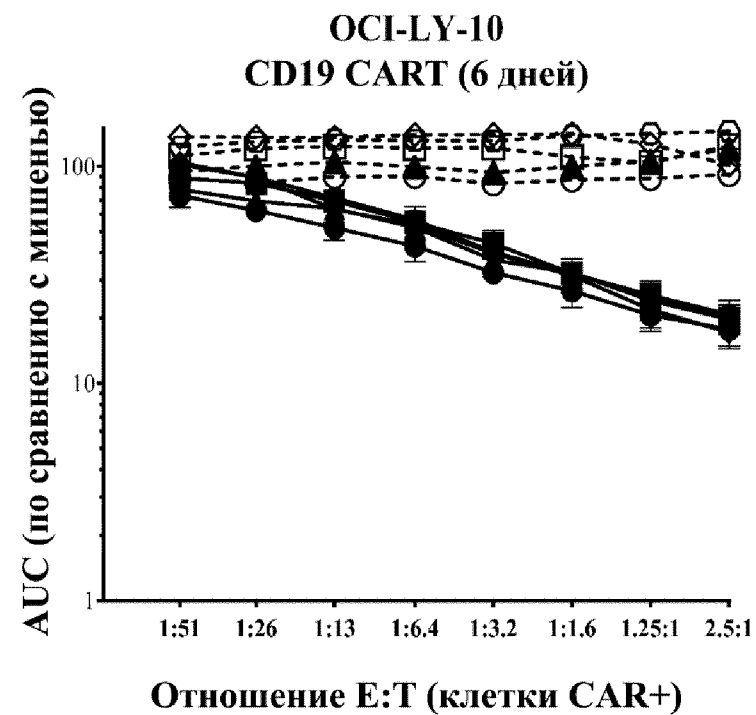
Фиг. 11С



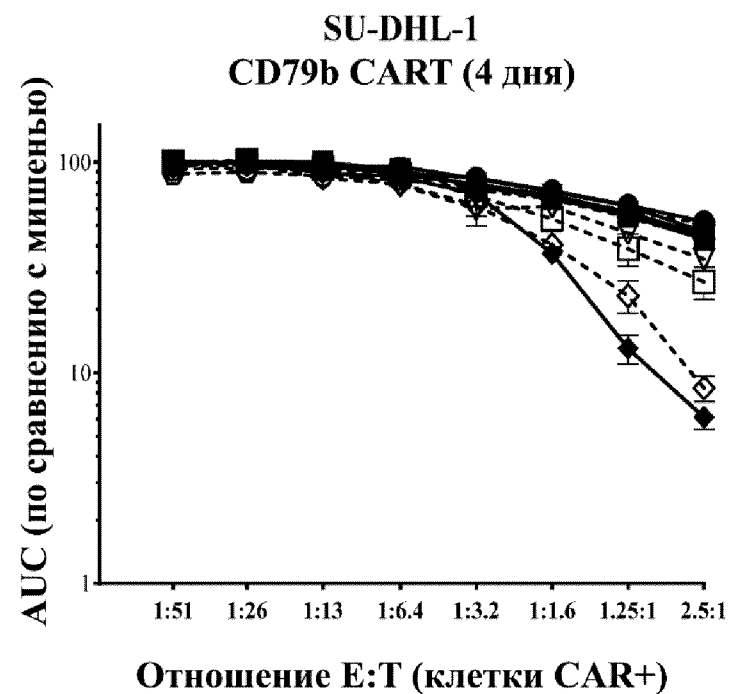
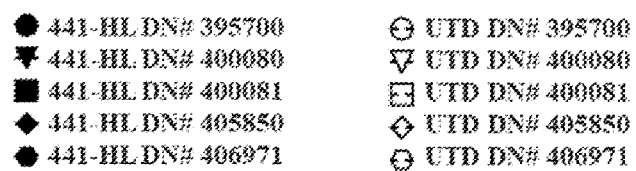
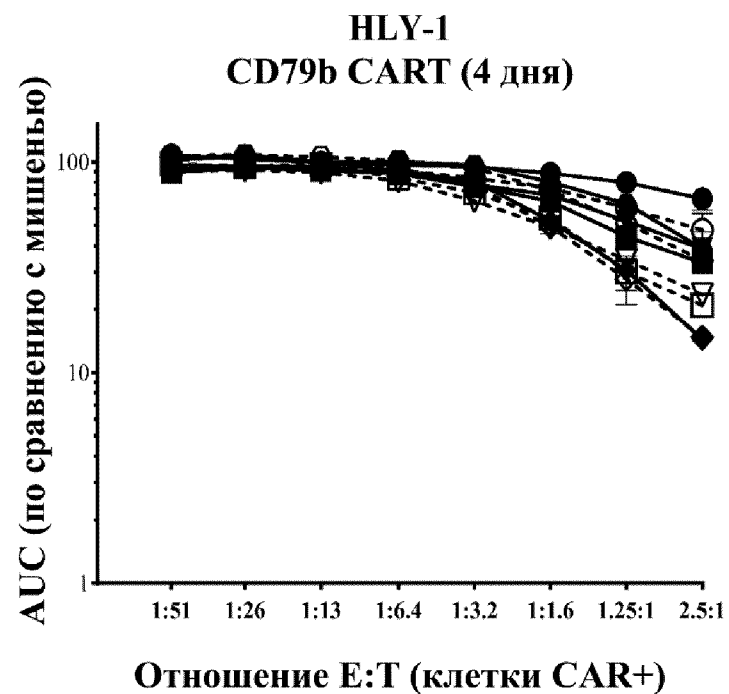
Фиг. 11D



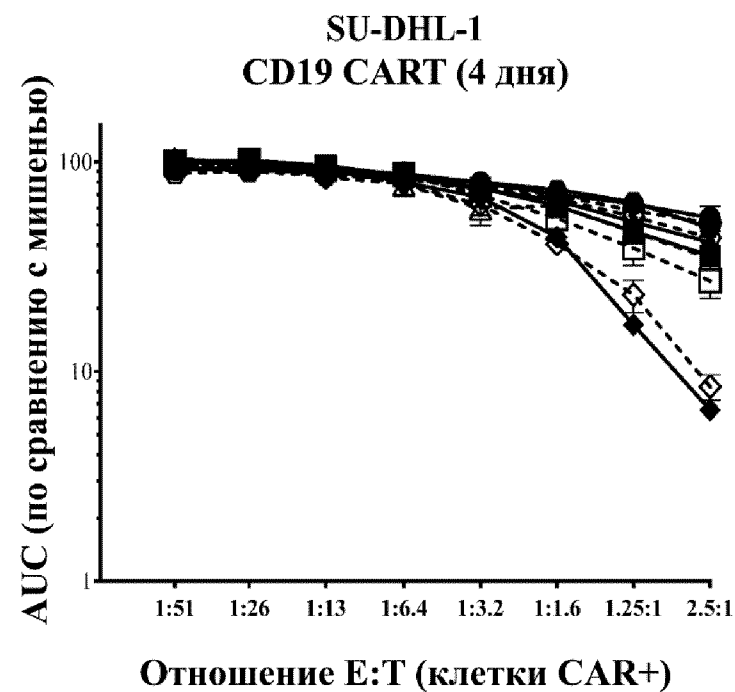
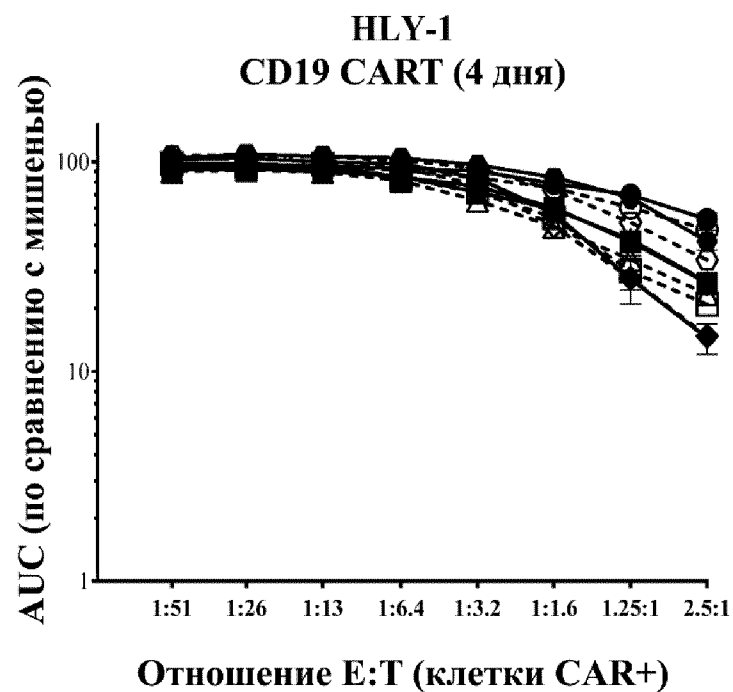
- | | |
|--------------------------|------------------|
| ● CD19 4-1BBz DN# 395700 | ○ UTD DN# 395700 |
| ▲ CD19 4-1BBz DN# 400080 | △ UTD DN# 400080 |
| ■ CD19 4-1BBz DN# 400081 | □ UTD DN# 400081 |
| ◆ CD19 4-1BBz DN# 405850 | ◇ UTD DN# 405850 |
| ● CD19 4-1BBz DN# 406971 | ○ UTD DN# 406971 |



Фиг. 11Е

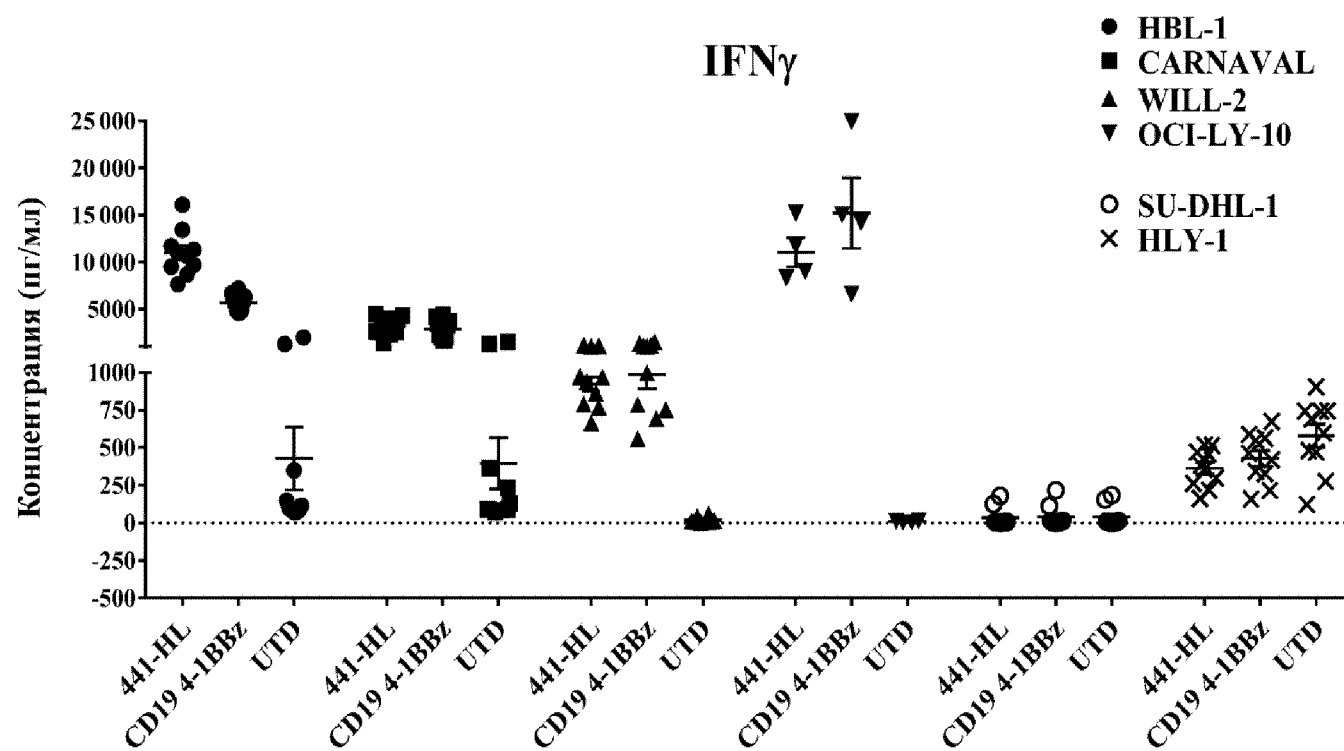


Фиг. 11F

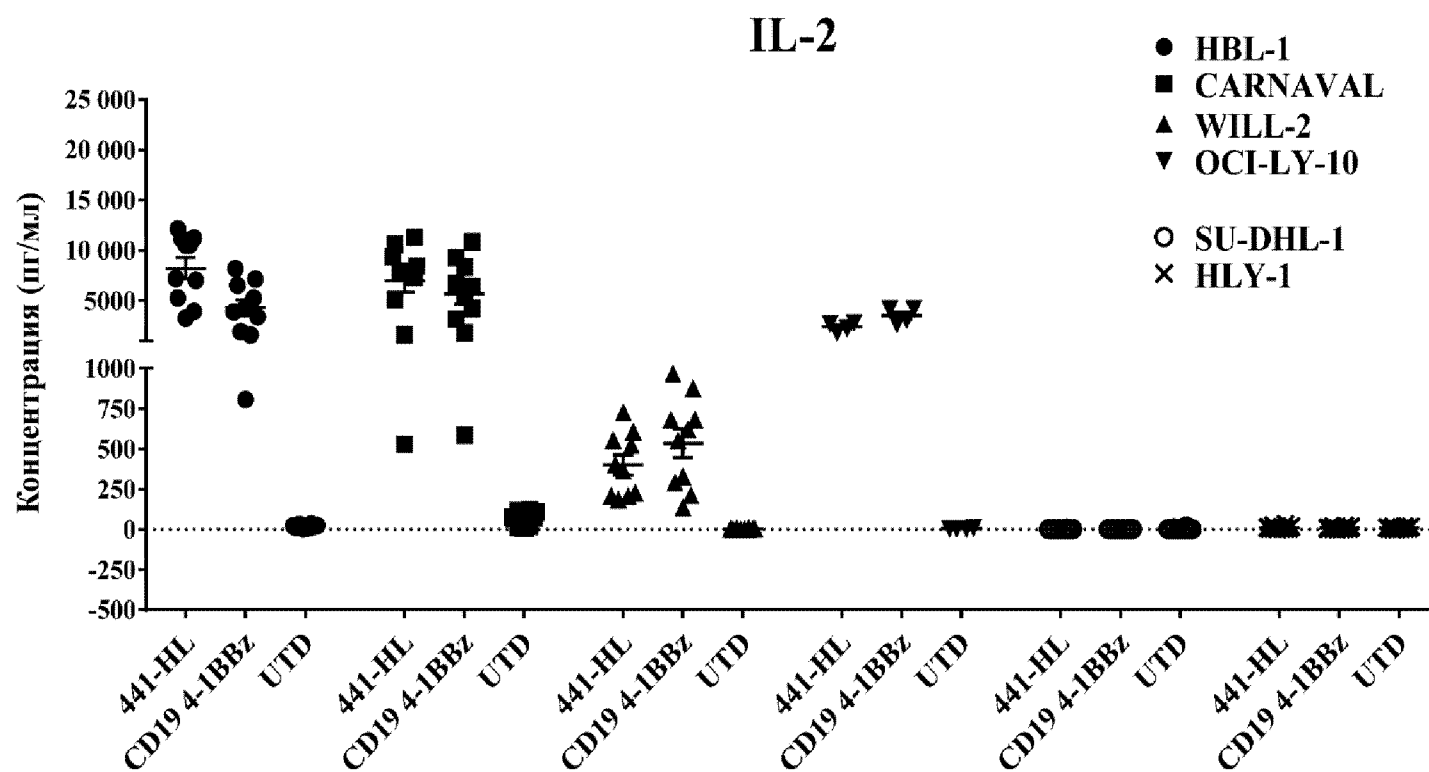


- | | |
|--------------------------|------------------|
| ● CD19 4-1BBz DN# 395700 | ⊙ UTD DN# 395700 |
| ▲ CD19 4-1BBz DN# 400080 | △ UTD DN# 400080 |
| ■ CD19 4-1BBz DN# 400081 | ◻ UTD DN# 400081 |
| ◆ CD19 4-1BBz DN# 405850 | ◊ UTD DN# 405850 |
| ● CD19 4-1BBz DN# 406971 | ⊙ UTD DN# 406971 |

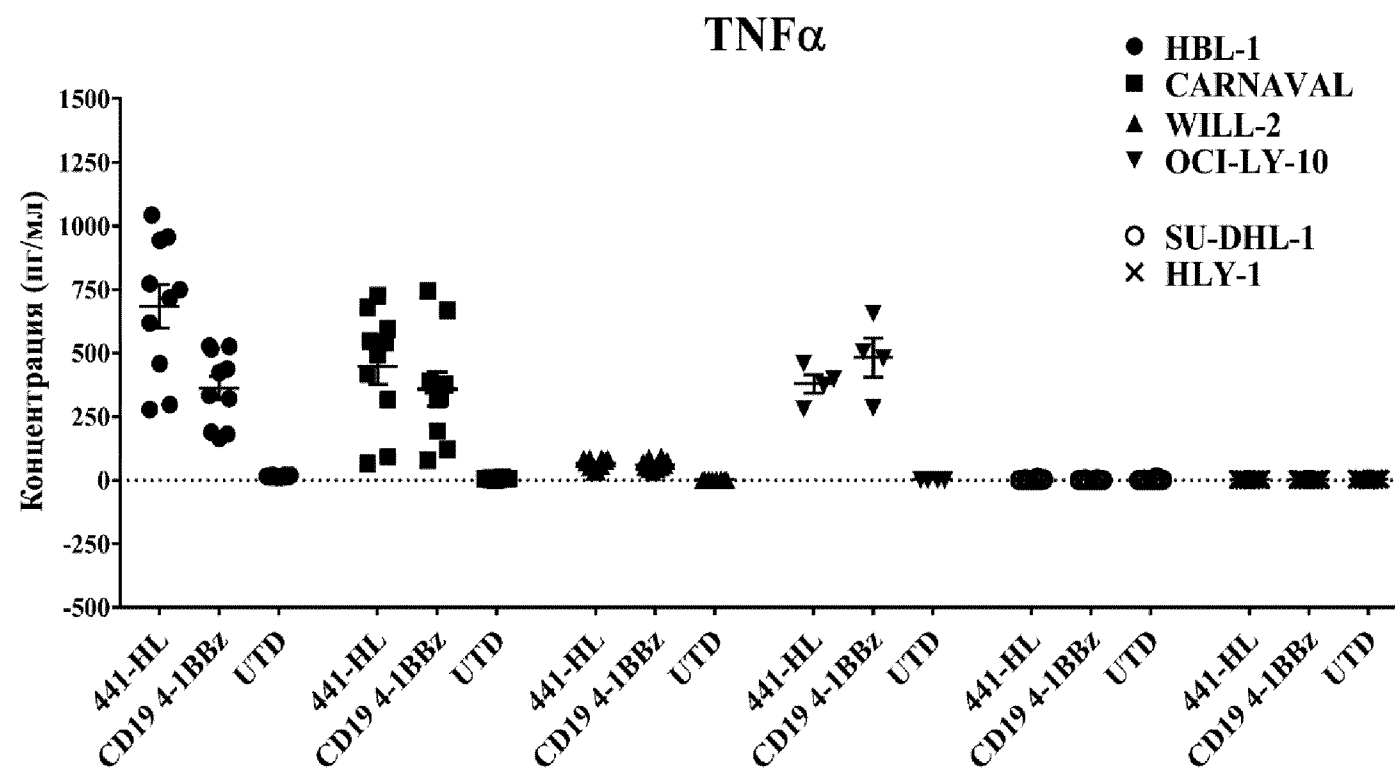
Фиг. 12А



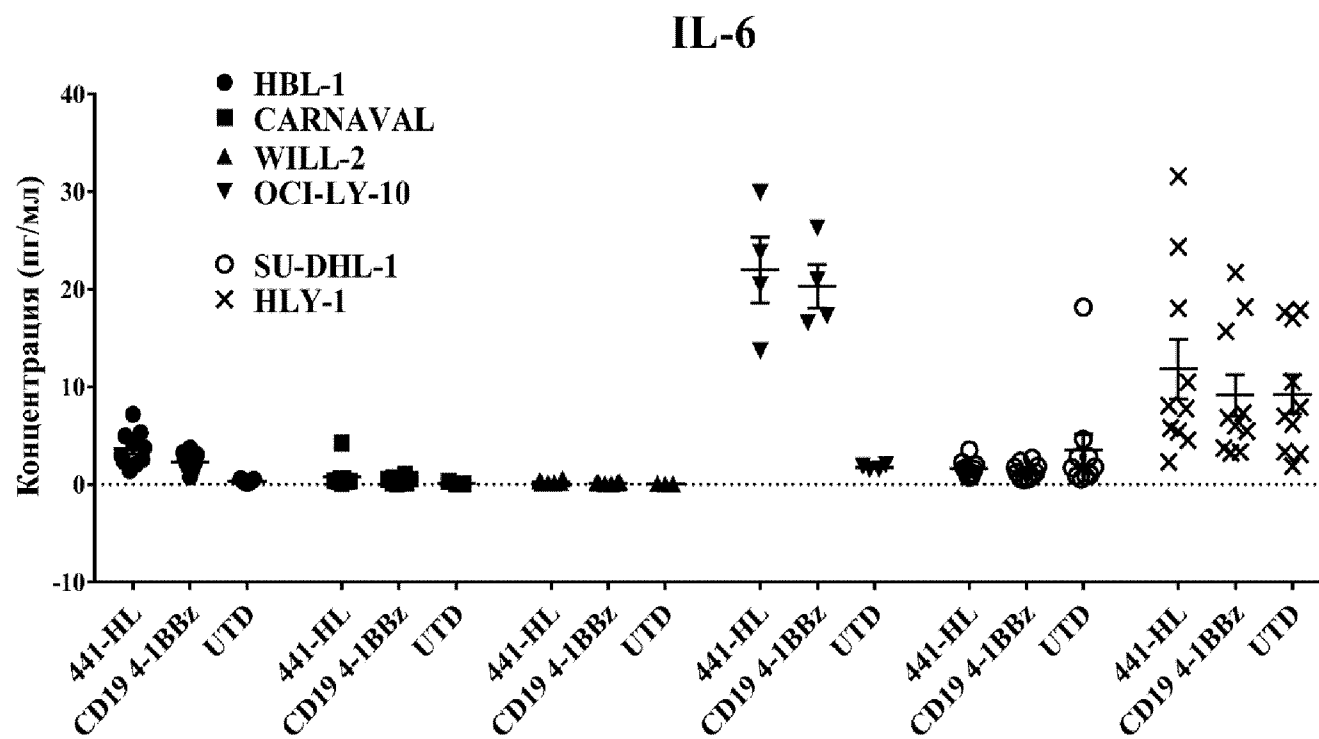
Фиг. 12В



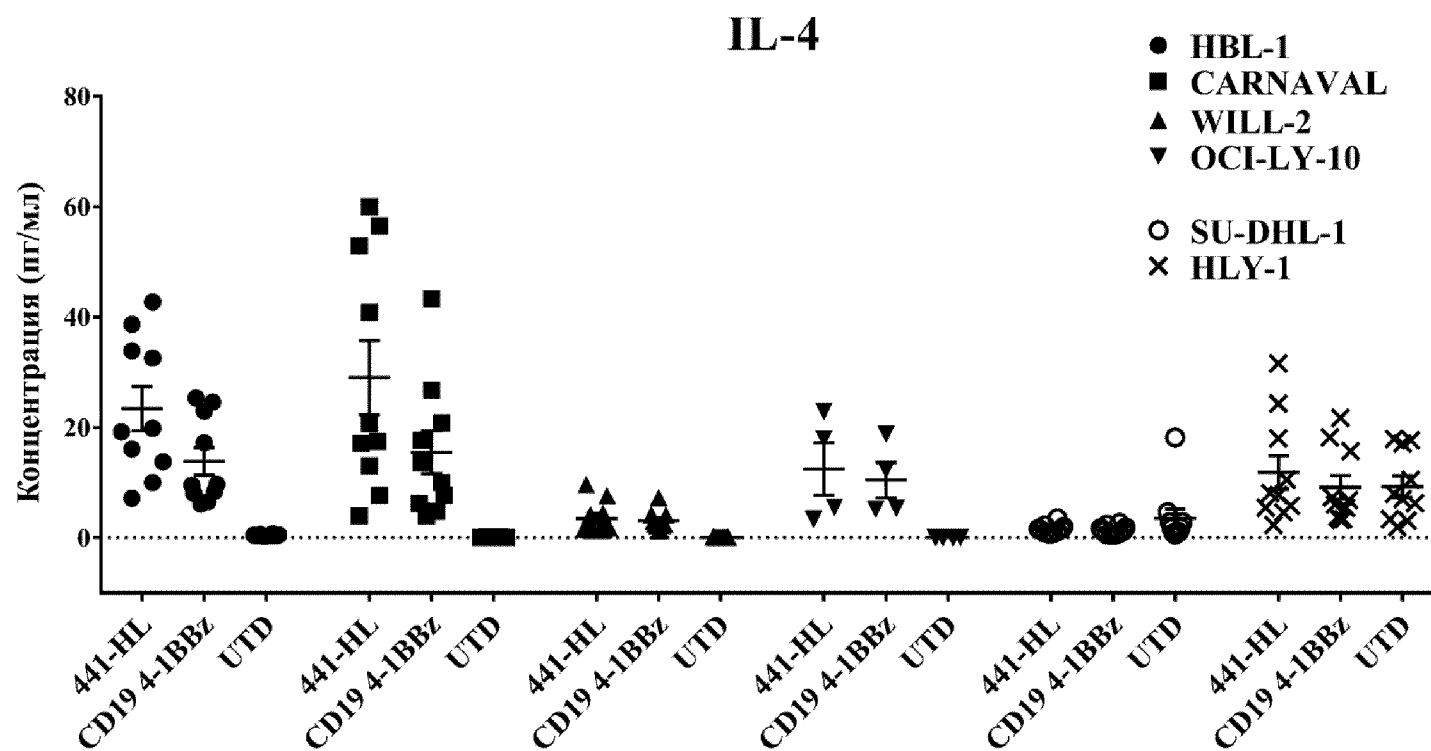
Фиг. 12С



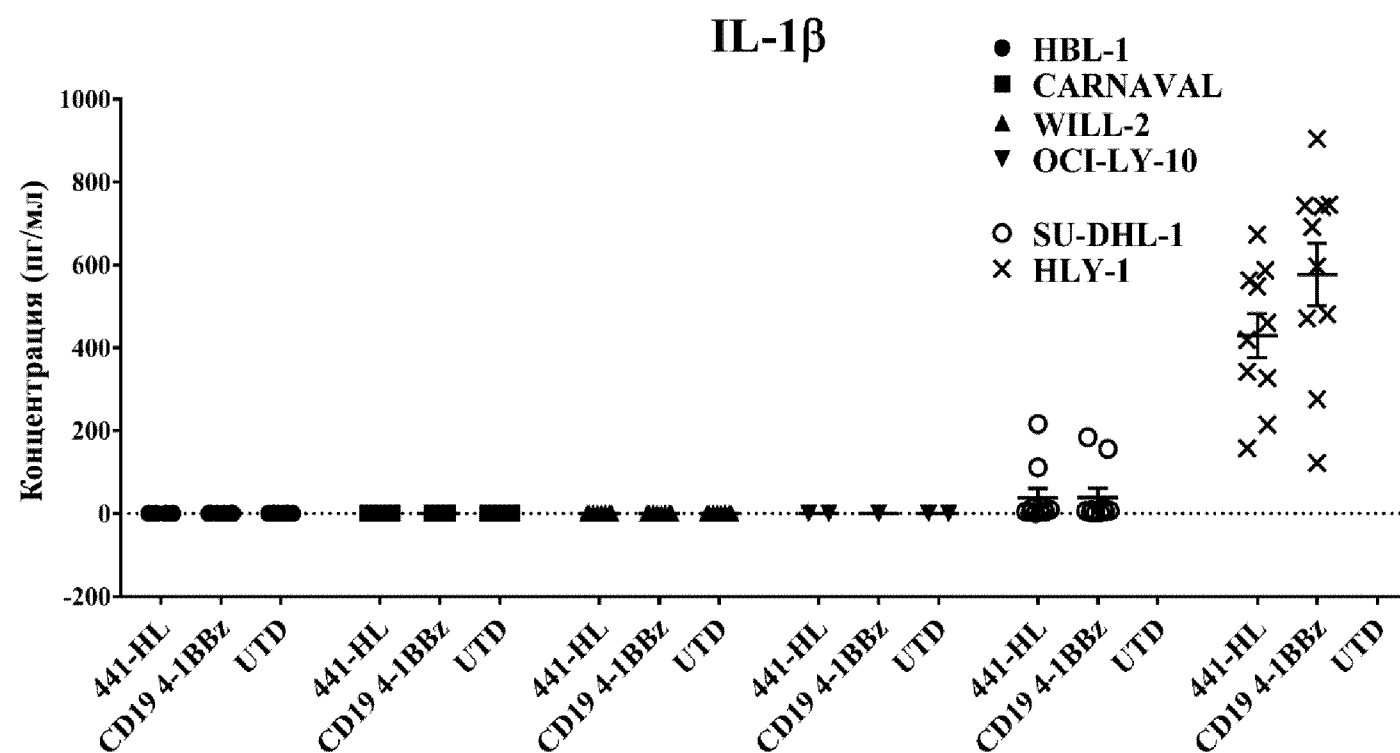
Фиг. 12D



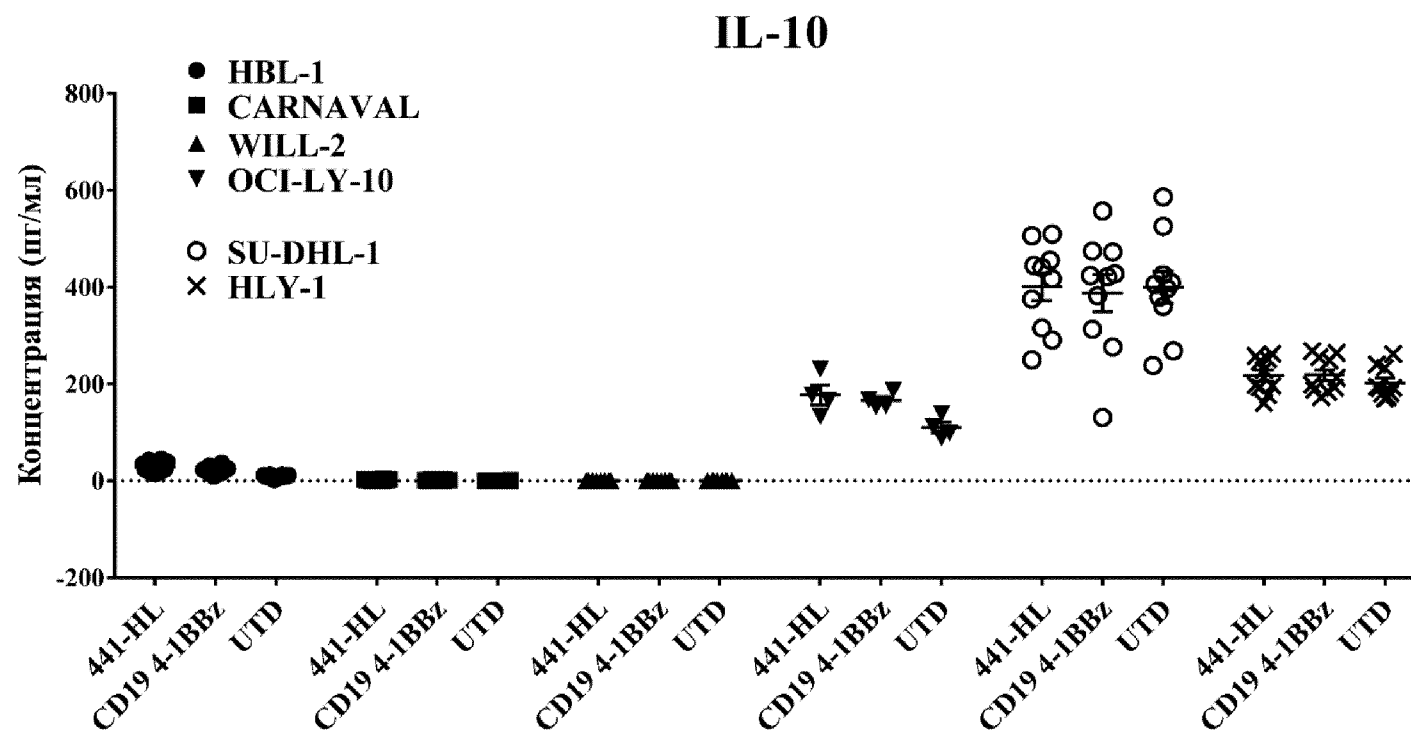
Фиг. 12Е



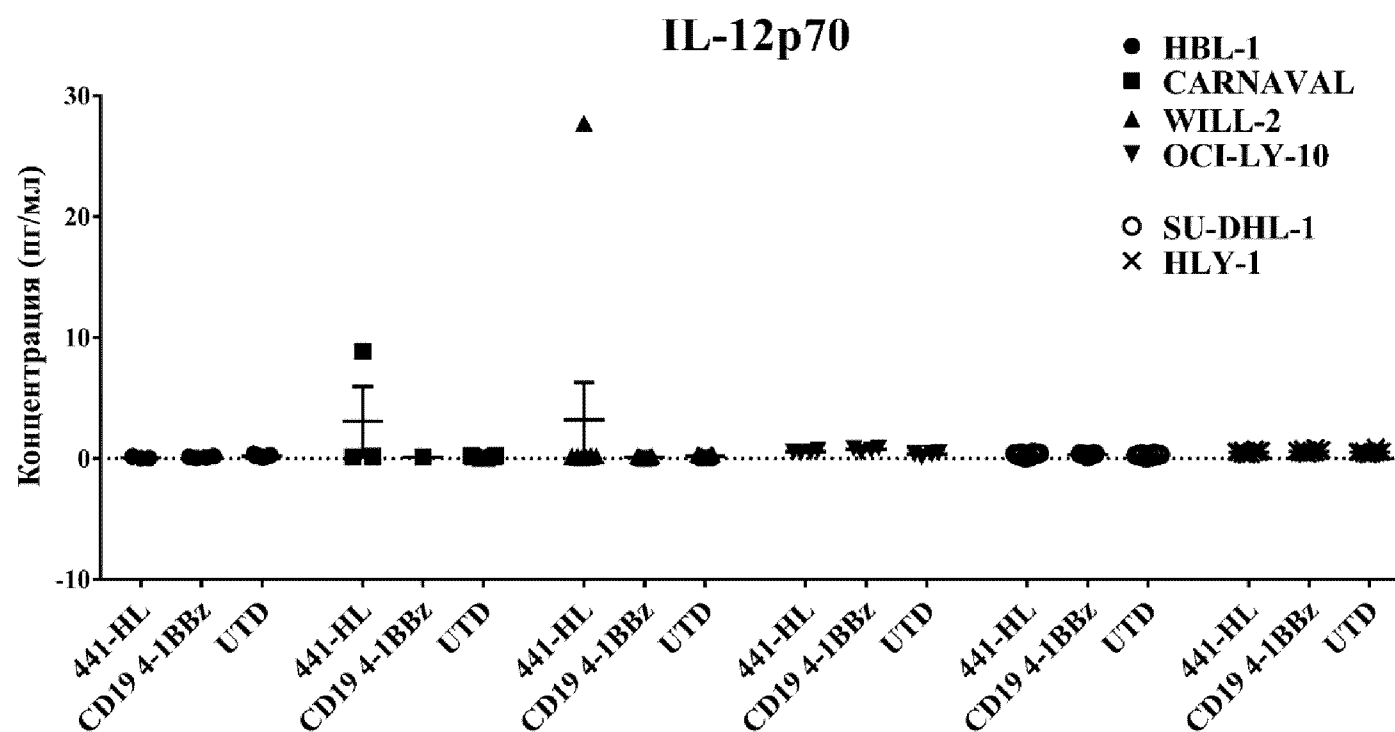
Фиг. 12F



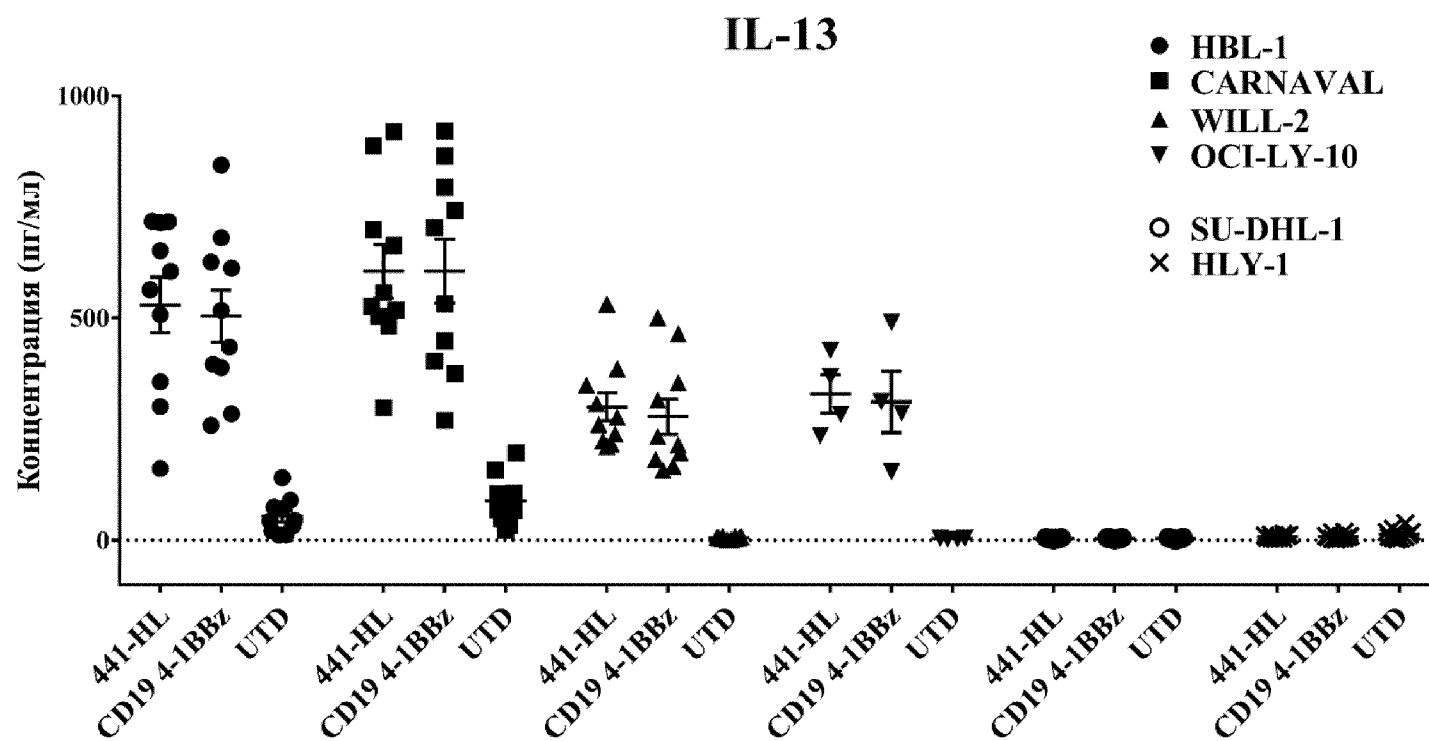
Фиг. 12G



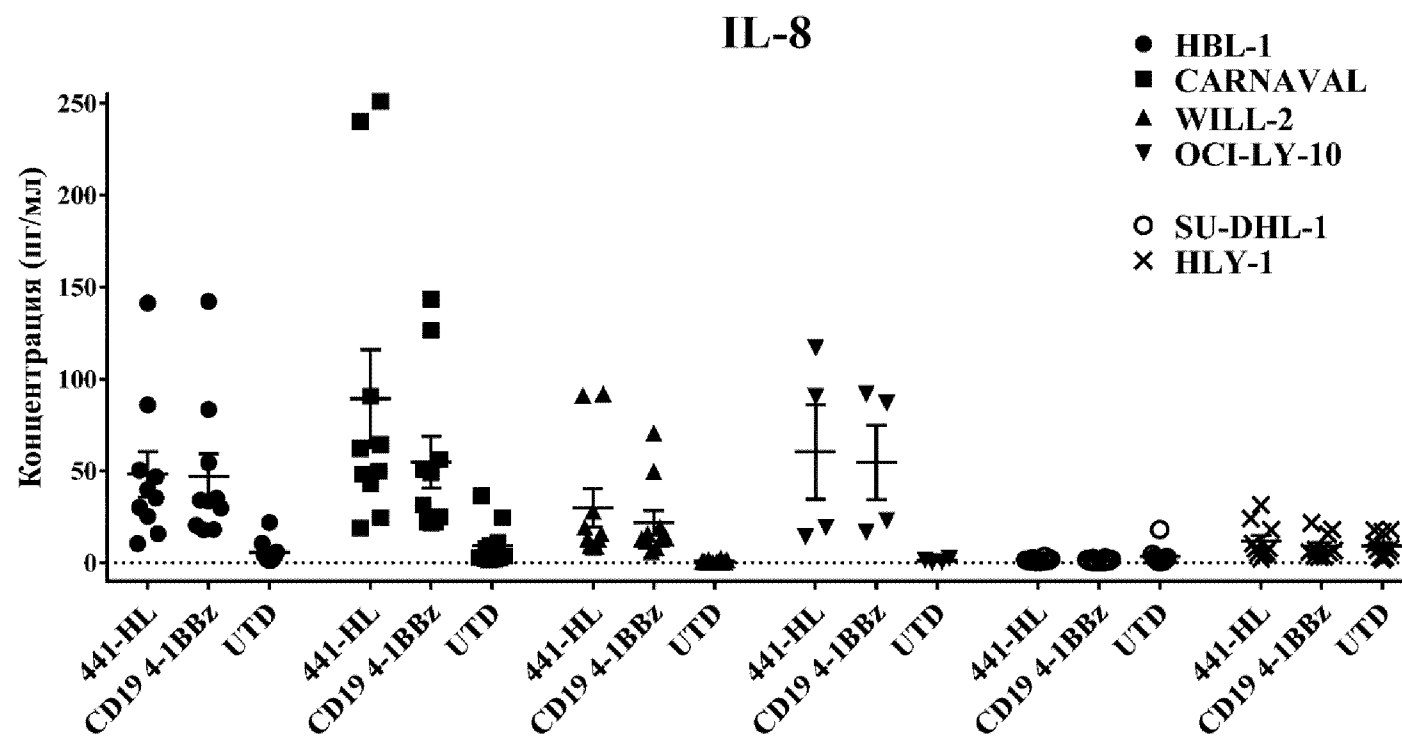
Фиг. 12Н



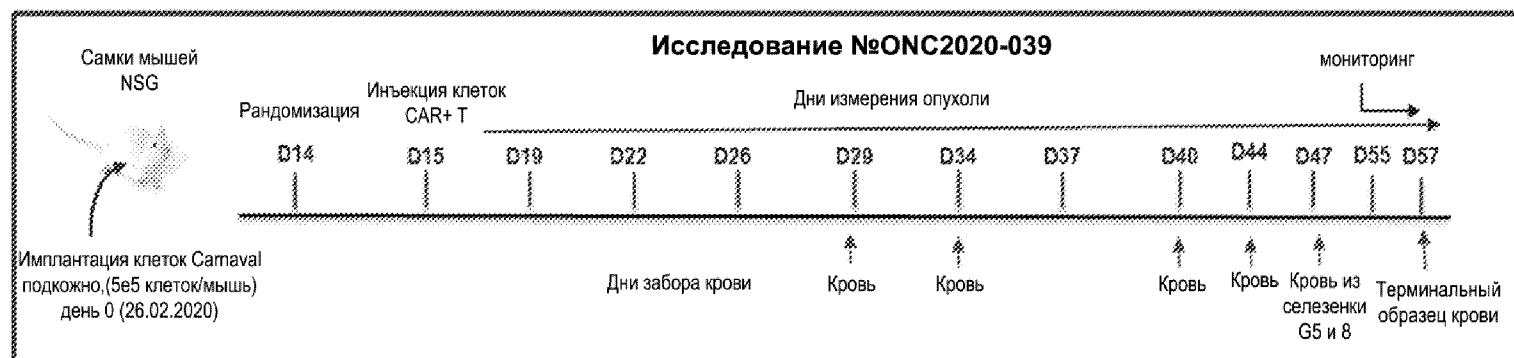
Фиг. 12I



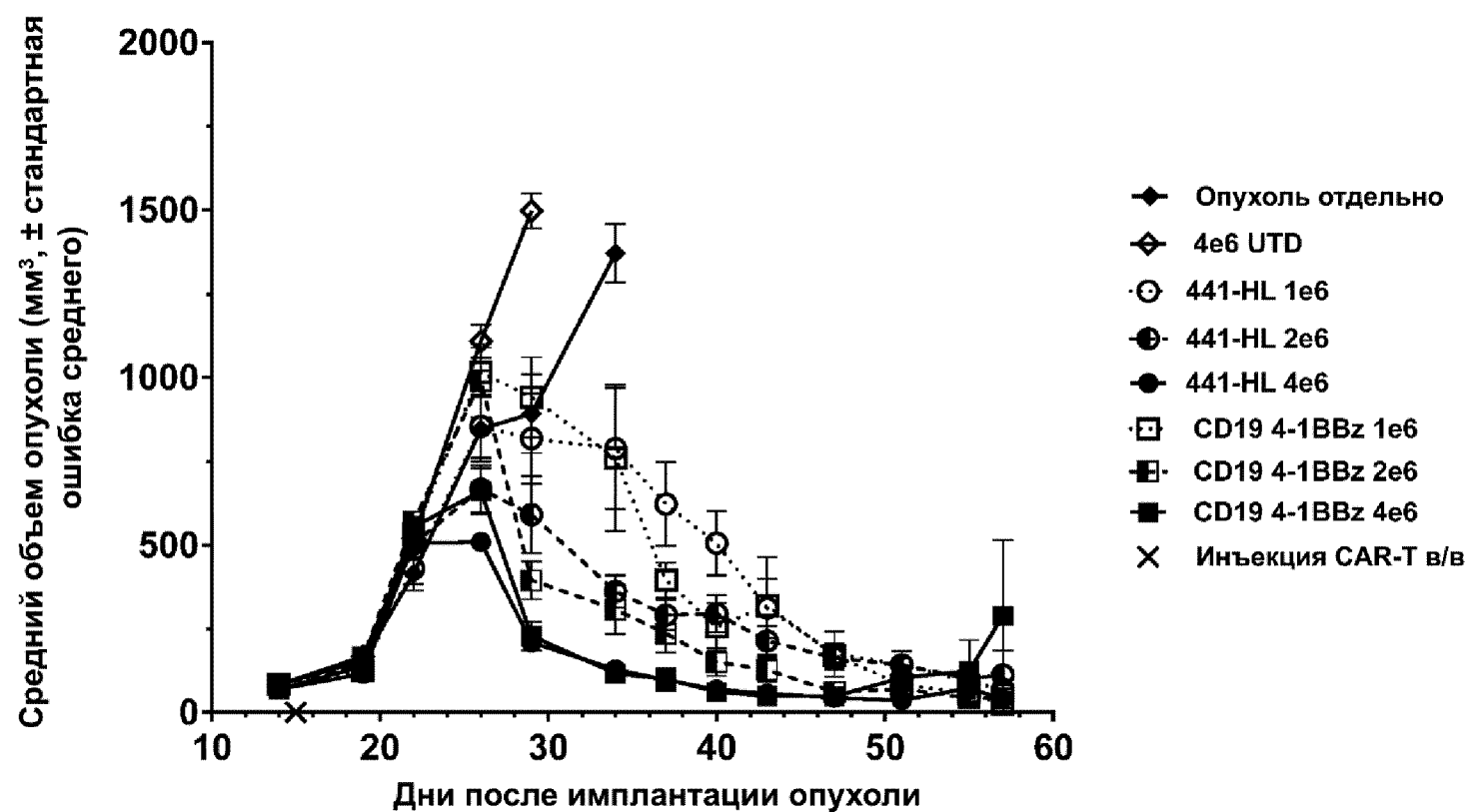
Фиг. 12J



Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 13С

