

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293067 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.03.02

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

(22) Дата подачи заявки  
2021.04.26

(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА CD19, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/015,362; 63/073,133

(32) 2020.04.24; 2020.09.01

(33) US

(86) PCT/US2021/029138

(87) WO 2021/217130 2021.10.28

(88) 2021.12.02

(71) Заявитель:

МЕМОРИАЛ СЛОАН-КЕТТЕРИНГ  
КЭНСЕР СЕНТЕР; МИЛЛЕННИУМ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.;  
СЛОАН-КЕТТЕРИНГ ИНСТИТУТ  
ФОР КЭНСЕР РИСЕРЧ;  
МЕМОРИАЛ ХОСПИТАЛ ФОР  
КЭНСЕР ЭНД ЭЛЛАЙД ДИЗИЗЕС  
(US)

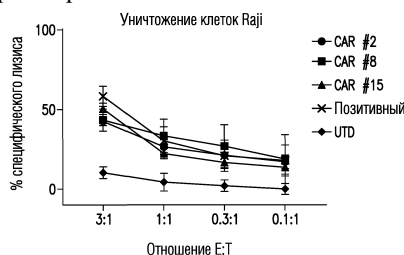
(72) Изобретатель:

Фойхт Юдит (DE), Мансилья-Сото  
Хорхе, Ривайер Изабель, Садлейн  
Мишель, Винсен Лоик, Шапиро Гари,  
Нг Мен Роса, Тейварс Ден, Хэ Синюэ  
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрытый здесь предмет изобретения относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), которые специфически нацелены на CD19, и к клеткам, содержащим такие CAR, нацеленные на CD19. Раскрытый здесь предмет изобретения также относится к применению CAR, нацеленных на CD19, для лечения, например, рака крови.



A1

202293067

202293067

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576341EA/042

### ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА CD19, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

#### 1. Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США с регистрационным номером 63/015362, поданной 24 апреля 2020 г., и предварительной заявки на патент США с регистрационным номером 63/073133, поданной 1 сентября 2020 г., содержание каждой из которых в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки, и в отношении каждой из которых испрашивается приоритет.

#### 2. Область техники

Настоящее изобретение относится к способам лечения новообразования (например, рака) с использованием клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически нацелен на CD19.

#### 3. Предпосылки создания изобретения

Клеточная иммунотерапия представляет собой терапию, которая может быть применена для лечения рака. Т-клетки и другие иммунные клетки могут быть модифицированы для нацеливания на опухолевые антигены путем введения генетического материала, кодирующего искусственные или синтетические рецепторы антигена, называемые химерными антигенными рецепторами (CAR), специфичными к выбранным антигенам. Надавню было показано, что нацеленная Т-клеточная терапия с использованием CAR дает клинический эффект при лечении гематологических злокачественных новообразований.

Было показано, что Т-клетки, экспрессирующие CD19-специфические CAR, содержащие связывающиеся с CD19 домены мышиных моноклональных антител, могут быть использованы для лечения В-клеточных злокачественных новообразований. Опосредованные Т-клетками иммунные ответы, специфичные для антигенсвязывающего домена CAR мышиного scFv, могут вырабатываться у человека и приводить к преждевременной элиминации CAR-Т-клеток, что будет увеличивать риск рецидива опухоли. Таким образом, существует потребность в получении CAR, нацеленных на CD19 и обладающих улучшенными свойствами, а именно, пониженной токсичностью и иммуногенностью и/или повышенной безопасностью и эффективностью.

#### 4. Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к нацеленным на CD19 химерным антигенным рецепторам (CAR), к клеткам, содержащим CAR, нацеленные на CD19, и к применению этих клеток для лечения, например, для лечения новообразований.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD19, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах

осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab или F(ab)<sub>2</sub>. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv представляет собой scFv человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит (а) переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; и/или (b) переменную область легкой цепи, содержащую:

i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или ее консервативную модификацию;

ii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, или ее консервативную модификацию;

iii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, или ее консервативную модификацию;

iv) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, или ее консервативную модификацию;

v) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную





В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой

цепи включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а переменная область легкой цепи включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а переменная область легкой цепи включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 или SEQ





цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи расположена в направлении от N-конца к C-концу:  $V_L$ - $V_H$ .

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен

содержит полипептид CD8, полипептид CD28, полипептид CD3 $\zeta$ , полипептид CD4, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид CTLA-4, полипептид PD-1, полипептид LAG-3, полипептид 2B4 или полипептид BTLA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен содержит полипептид CD28.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD3 $\zeta$  представляет собой модифицированный полипептид CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит нативный ITAM1, вариант ITAM2, состоящий из двух мутаций с потерей функции, и вариант ITAM3, состоящий из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нативный ITAM1 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM2 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM3 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид DAP-10 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный домен CD28 или его часть, внутриклеточный домен 4-1BB или его часть, внутриклеточный домен OX40 или его часть, внутриклеточный домен ICOS или его часть, или внутриклеточный домен DAP-10 или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR экспрессируется из вектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой ретровирусный вектор.

Настоящее изобретение также относится к клеткам, содержащим CAR, раскрытые в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетку трансдуцируют CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR конститутивно экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой иммунореактивную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой клетку

лимфоидного происхождения или клетку миелоидного происхождения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, природной клетки-киллера (NK), стволовой клетки, из которой могут быть дифференцированы лимфоидные клетки, и стволовой клетки, из которой могут быть дифференцированы миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Т-клетка выбрана из группы, состоящей из хелперных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток, Т-клеток памяти, регуляторных Т-клеток, опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), природных Т-клеток-киллеров, инвариантных Т-клеток, ассоциированных со слизистой оболочкой, и  $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, NK-клетка происходит от стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбрионидную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку.

Кроме того, раскрытый здесь предмет изобретения относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим CAR, раскрытый в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, функционально связанный с CAR. Промотор может быть эндогенным или экзогенным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой экзогенный промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экзогенный промотор выбран из группы, состоящей из промотора фактора элонгации (EF)-1, предраннего промотора цитомегаловируса (CMV), раннего промотора обезьяньего вируса 40 (SV40), промотора фосфоглицераткиназы (PGK), промотора металлотioneина и промотора убихитина С. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой эндогенный промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эндогенный промотор выбран из промотора TCR-альфа, промотора TCR-бета и промотора бета-2-микроглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой индуцибельный промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индуцибельный промотор выбран из группы, состоящей из промотора элемента транскрипционного ответа (TRE) NFAT, промотора CD69, промотора CD25, промотора IL-2, промотора 4-1BB, промотора PD1 и промотора LAG3.

Раскрытый здесь предмет изобретения также относится к векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой ретровирусный вектор.

Раскрытый здесь предмет изобретения также относится к клеткам, экспрессирующим молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой Т-клетку

или природную клетку-киллер (NK).

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к композициям, содержащим описанную здесь клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция содержит от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $5 \times 10^8$  клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция содержит от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $1 \times 10^8$  клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция содержит от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $5 \times 10^7$  клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция содержит приблизительно  $2,5 \times 10^7$  клеток.

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к различным способам применения клеток согласно изобретению. Раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам уменьшения опухолевой нагрузки у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает введение индивидууму клеток или композиции, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ позволяет уменьшать количество опухолевых клеток, уменьшать размер опухоли и/или уничтожать опухоль у индивидуума.

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам увеличения или удлинения продолжительности жизни индивидуума, имеющего новообразование. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает введение индивидууму клеток или композиции, раскрытых в настоящей заявке.

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам лечения и/или профилактики новообразования у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает введение индивидууму клеток или композиции, раскрытых в настоящей заявке.

Раскрытые здесь клетки и композиции могут быть использованы в терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытые здесь клетки и композиции применяют для лечения и/или профилактики новообразования у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытые здесь клетки и композиции применяют для увеличения или удлинения продолжительности жизни индивидуума, имеющего новообразование. В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытые здесь клетки и композиции применяют для лечения и/или профилактики новообразования у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование ассоциированы с CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование представляет собой рак крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак крови выбран из группы, состоящей из множественной миеломы, лейкоза и лимфом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лейкоз выбран из группы, включающий острый миелоидный лейкоз (ОМЛ),

хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), острый лейкоз смешанного фенотипа (ОЛСФ), ретикулоэндотелиоз и В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лимфома представляет собой лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления изобретения, В-клеточное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из В-клеточных неходжкинских лимфом (НХЛ), В-клеточных лимфом Ходжкина, В-клеточного острого лимфолейкоза (ОЛЛ), В-клеточного хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), множественной миеломы (ММ), ХЛЛ с трансформацией Рихтера и лимфомы ЦНС. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления изобретения, В-клеточная лимфома представляет собой рецидивирующую или рефрактерную (R/R) В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является человек.

Кроме того, раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам получения клетки, содержащей CAR, раскрытый в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей описанный здесь CAR.

Кроме того, раскрытый здесь предмет изобретения относится к наборам для уменьшения опухолевой нагрузки у индивидуума, лечения и/или профилактики новообразования у индивидуума и/или увеличения или удлинения продолжительности жизни индивидуума, имеющего новообразование. В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор содержит описанную здесь клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, набор дополнительно содержит письменные инструкции по применению клетки для уменьшения опухолевой нагрузки у индивидуума, лечения и/или профилактики новообразования у индивидуума и/или увеличения или удлинения продолжительности жизни индивидуума, имеющего новообразование.

##### 5. Краткое описание чертежей

На фигурах 1А и 1В показана цитотоксичность Т-клеток, содержащих CAR, нацеленные на CD19, по отношению к клеткам, экспрессирующим CD19. На фигуре 1А показано уничтожение CD19-экспрессирующих линий раковых клеток Raji. На фигуре 1В показано уничтожение клеток Raji, нокаутированных по CD19. Позитивным контролем является 1928z-1XX CAR.

На Фигурах 2А и 2В показана цитотоксичность Т-клеток, содержащих CAR, нацеленные на CD19, по отношению к клеткам, экспрессирующим CD19, как было оценено с помощью анализа на цитолиз на основе проточной цитометрии. На фигуре 2А показано уничтожение CD19-экспрессирующих линий раковых клеток Raji. На фигуре 2В показано уничтожение клеток Raji, нокаутированных по CD19. Позитивным контролем

является 1928z-1XX CAR.

На Фигурах 3А и 3В показана секреция цитокинов IL-2 Т-клетками, содержащими CAR, нацеленные на CD19. На фигуре 3А показана секреция цитокина IL-2 Т-клетками, содержащими CAR, нацеленные на CD19 и совместно культивированными с линиями раковых клеток Raji, экспрессирующими CD19. На фигуре 3В показана секреция цитокина IL-2 Т-клетками, содержащими CAR, нацеленные на CD19, и совместно культивированными с клетками Raji, нокаутированными по CD19. Позитивным контролем является 1928z-1XX CAR.

На Фигурах 4А и 4В показана секреция цитокинов IFN- $\gamma$  Т-клетками, содержащими CAR, нацеленные на CD19. На фигуре 4А показана секреция цитокина IFN- $\gamma$  Т-клетками, содержащими CAR, нацеленные на CD19, и совместно культивированными с CD19-экспрессирующими линиями раковых клеток Raji. На фигуре 4В показана секреция цитокина IFN- $\gamma$  Т-клетками, содержащими CAR, нацеленные на CD19, и совместно культивированными с клетками Raji, нокаутированными по CD19. Позитивным контролем является 1928z-1XX CAR.

На фигуре 5 показана противоопухолевая активность Т-клеток *in vivo*, содержащих CAR, нацеленные на CD19. #17 означает негативный контроль, представляющий собой CAR, нацеленный на CD19, и не имеющий детектируемой активности *in vivo*.

На фигуре 6 показана аминокислотная последовательность CD19-HSA-His10.

На фигуре 7 показаны данные связывания scFv #2, scFv SJ25c1 и scFv FMC63. Относительную конкуренцию за общий эпитоп в растворимом антигене CD19 оценивали в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore. Смесь растворимых специфичных к CD19 антител (FMC63 или SJ25c1) и антигена CD19 наносили на чип, содержащий scFv #2, для того, чтобы определить, конкурирует ли scFv #2 с тем же эпитопом, что и scFv SJ25c1 и scFv FMC63. 19(T2) представляет собой «#2 scFv».

На Фигуре 8 показан гамма-ретровирусный вектор, содержащий CAR #2. «19(T2)» представляет «#2». CAR #2 содержит CD19-специфический T2 (19(T2)) scFv (или "#2 scFv"), лидерный пептид CD8-альфа, фрагмент гена CD28 и модифицированный внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ . Фрагмент гена CD28 включает его внеклеточный шарнирный, трансмембранный и внутриклеточный домены. Модифицированная цепь CD3 $\zeta$  имеет один функциональный мотив активации дикого типа и два мутантных мотива активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM), обозначенные как «1XX». Аминокислотная последовательность модифицированного внутриклеточного сигнального домена CD3 $\zeta$  представлена в SEQ ID NO: 43. Сопоставление аминокислотной последовательности CD3 $\zeta$ -1XX с CD3 $\zeta$ -дикого типа представлено на Фигуре 9. Различия аминокислот между двумя последовательностями помечены.

На фигуре 9 показано выравнивание аминокислотной последовательности CD3 $\zeta$ -1XX с CD3 $\zeta$  дикого типа.

На Фигуре 10 показана цитотоксическая активность *in vitro* CAR-T-клеток #2 и CAR-T-клеток 1928z-1XX. «19(T2)28z1xx» означает «#2 CAR».

На Фигуре 11 показано элиминирование опухоли с помощью CAR-T-клеток #2 и CAR-T-клеток 1928z-1XX. «19(T2)28z1xx» означает «#2 CAR».

На Фигуре 12 показан гамма-ретровирусный вектор, содержащий CAR 1928z. Аминокислотная последовательность hCD3 $\zeta$  дикого типа показана на Фигуре 9 как SEQ ID NO: 30.

На фигуре 13 показана экспрессия CAR в трансдуцированных  $\gamma$ -ретровирусом CD4<sup>+</sup>-и CD8<sup>+</sup>-Т-клетках. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

На Фигуре 14 показаны фенотипы CAR-T-клеток 1928z и CAR-T-клеток #2. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

На фигуре 15 представлена кинетика удаления опухоли с помощью CAR-T-клеток #2 и CAR-T-клеток 1928z. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR». Каждая кривая представляет опухолевую нагрузку у одной мыши.

На Фигуре 16 показана выживаемость мышей, имеющих лейкоз NALM6, после внутривенного вливания CAR-T-клеток #2 или CAR-T-клеток 1928z. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

На Фигуре 17 представлена количественная оценка и фенотипирование CAR-T-клеток в костном мозге мышей, обработанных CAR-T-клетками #2 или CAR-T-клетками 1928z (день 17). Все данные представляют собой среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение, и для расчета р-значений использовали двусторонний непарный t-критерий Стьюдента. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

На Фигуре 18 показана масса тела мышей после обработки CAR-T-клетками #2 или CAR-T-клетками 1928z. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR». Звездочкой отмечены моменты времени, когда произошла незапланированная гибель. Более короткие кривые представляют гибель всех мышей в указанный момент времени.

На Фигуре 19 показано количественное определение ферментов печени в сыворотке мышей, получавших  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток на 10-й и 27-й/28-й день после инфузии. Статистические сравнения проводились между двумя группами в один и тот же день. Все данные представляют собой среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение, и для расчета р-значений использовали двусторонний непарный t-критерий Стьюдента. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

На Фигуре 20 представлена количественная оценка уровней человеческих цитокинов у мышей, получавших  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток #2 или CAR-T-клеток 1928z на 10-й и 27-й/28-й день после инфузии. Все данные представляют собой среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение, и для расчета р-значений использовали двусторонний непарный t-критерий Стьюдента. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

Фигура 21. Количественное определение уровней мышинных цитокинов у мышей, получавших  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток #2 или CAR-T-клеток 1928z на 10-й и 27-й/28-й день после инфузии. Все данные представляют собой среднее  $\pm$  среднеквадратичное

отклонение, и для расчета р-значений использовали двусторонний непарный t-критерий Стьюдента. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

На Фигуре 22 показано количественное определение основных клеток крови у мышей, получавших CAR-T-клетки #2 и CAR-T-клетки 1928z на 27/28 день после инфузии. Все данные представляют собой среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение, и для расчета р-значений использовали двусторонний непарный t-критерий Стьюдента. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

На Фигуре 23 показано сравнение массы тела и основных органов мышей, получавших #2 CAR-T-клетки и CAR-T-клетки 1928z на 27/28-й день после инфузии. Количество мышей в группе указано в пояснениях к графику. Все данные представляют собой среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение, и для расчета р-значений использовали двусторонний непарный t-критерий Стьюдента. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

На Фигуре 24 показана количественная оценка лимфоцитов и опухолевой инфильтрации в печени, селезенке и костном мозге мышей, получавших CAR-T-клетки. Все данные представляют собой среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение, и для расчета р-значений использовали двусторонний непарный t-критерий Стьюдента. «19(T2)28z1XX» представляет «#2 CAR».

На Фигуре 25 представлены репрезентативные хроматограммы проточной цитометрии для антител против CD19, связывающихся с CD19 на CD19-экспрессирующих клетках Raji и NALM-6 дикого типа и на клетках, нокаутированных по CD19.

На Фигурах 26А-26С представлены репрезентативные кривые связывания анти-CD19 антител, связывающихся с CD19 на клетках NALM-6.

#### 6. Подробное описание

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), которые специфически нацелены на CD19, и к клеткам, содержащим такие нацеленные на CD19 CAR. Клетки могут быть иммунореактивными клетками, например, генетически модифицированными иммунореактивными клетками (например, Т-клетками или NK-клетками). Раскрытый здесь предмет изобретения также относится к применению клеток и композиций, содержащих эти клетки, для лечения, например, для лечения новообразований. Описанные здесь CAR, нацеленные на CD19, оказались более безопасными и/или более эффективными, чем другие CAR, нацеленные на CD19, например, о чем свидетельствует их более высокая стабильность (см. Примеры 6 и 7). Также было показано, что такая более высокая стабильность не представляет риска для безопасности. Соответственно, описанные здесь CAR-T-клетки, нацеленные на CD19, могут быть использованы в более низкой дозе, чем большинство CAR-T-клеток, нацеленных на CD19, которые используются в современной иммунотерапии. Ожидается, что описанные здесь CAR-T-клетки, нацеленные на CD19, будут более безопасными, и, таким образом, будут давать меньше побочных эффектов, включая, помимо прочего, меньшую частоту встречаемости синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и нейротоксичности (NT).



Неограничивающие варианты осуществления изобретения описаны в настоящем описании и в Примерах.

Для лучшего понимания изобретения, подробное описание разделено на следующие подразделы, которые не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения:

- 5.1. Определения;
- 5.2. CD19;
- 5.3. Химерные антигенные рецепторы (CAR);
- 5.4. Клетки;
- 5.5. Молекулы нуклеиновых кислот и векторы;
- 5.6. Препараты и их введение; и
- 5.7. Способы лечения

### ***5.1 Определения***

Если это не оговорено особо, то все используемые здесь технические и научные термины имеют свое общепринятое значение, понятное специалисту в области, к которой относится раскрытый здесь предмет изобретения.

Используемый здесь термин «примерно» или «приблизительно» относится к допустимому диапазону ошибок для конкретного значения, определенному специалистом в данной области, где указанный диапазон будет частично зависеть от того, как это значение вычисляют или определяют, то есть, от ограничений системы измерения. Так, например, «приблизительно» может означать значение в пределах 3 или более стандартных отклонений в соответствии с данной практикой. Альтернативно, «приблизительно» может означать диапазон до 20%, предпочтительно до 10%, более предпочтительно до 5%, а еще более предпочтительно до 1% от заданного значения. Альтернативно, а в частности, в отношении биологических систем или процессов, этот термин может означать значение в пределах порядка, предпочтительно в пределах 5-кратного, а более предпочтительно, в пределах 2-кратного значения.

Используемый здесь термин «иммунореактивная клетка» относится к клетке, которая функционирует при иммунном ответе, или к ее предшественнику, или к ее потомству. В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунореактивная клетка представляет собой клетку лимфоидного происхождения. Неограничивающие примеры клеток лимфоидного происхождения включают Т-клетки, природные клетки-киллеры (NK), В-клетки и стволовые клетки, из которых могут быть дифференцированы лимфоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунореактивная клетка представляет собой клетку миелоидного происхождения.

Используемый здесь термин «активирует иммунореактивную клетку» относится к индуцированию передачи сигнала или к изменениям экспрессии белка в клетке, что приводит к инициации иммунного ответа. Так, например, если цепи CD3 кластеризуются в ответ на связывание лиганда и мотивы ингибирования иммунорецептора на основе тирозина (ITAM), то продуцируется каскад передачи сигналов. В некоторых вариантах

осуществления изобретения, если CAR связывается с антигеном, то происходит образование иммунологического синапса, который включает кластеризацию многих молекул вблизи связанного рецептора (например, CD4 или CD8, CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$  и т.п.). Такая кластеризация связанных с мембраной сигнальных молекул позволяет мотивам ITAM, содержащимся в цепях CD3, фосфорилироваться. Это фосфорилирование, в свою очередь, инициирует путь активации Т-клеток, и в конечном счете, активирует факторы транскрипции, такие как NF- $\kappa$ -B и AP-1. Эти факторы транскрипции индуцируют общую экспрессию гена Т-клетки, что приводит к увеличению продуцирования IL-2 для пролиферации и экспрессии главных регуляторных Т-клеточных белков, с последующей инициацией иммунного ответа, опосредованного Т-клетками.

Используемый здесь термин «стимулирует иммунореактивную клетку» относится к сигналу, который приводит к сильному и устойчивому иммунному ответу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, это происходит после активации иммунореактивных клеток (например, Т-клеток) или одновременно опосредуется через рецепторы, включая, но не ограничиваясь ими, CD28, 4-1BB, OX40, CD40 и ICOS. Прием множества стимулирующих сигналов может иметь важное значение для вырабатывания надежного и долгосрочного иммунного ответа, опосредованного Т-клетками. Т-клетки могут быстро ингибироваться и становятся невосприимчивыми к антигену. Хотя эффекты этих костимулирующих сигналов могут различаться, однако, они обычно приводят к усилению экспрессии генов с образованием долгоживущих, пролиферативных и антиапоптотических Т-клеток, которые стабильно реагируют на антиген с его последующим полным и устойчивым удалением.

Используемый здесь термин «комплементарность-определяющие области» или «CDR» определяется как аминокислотные последовательности комплементарность-определяющей области антитела, которые представляют собой гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «CDR» вариабельного домена представляют собой аминокислотные остатки в пределах вариабельной области, которые идентифицируют в соответствии с определениями по Кэбату, по Чотию, по Кэбату и Чотию, по AbM, по контактированию и/или по конформации или любым способом определения CDR, хорошо известным специалистам в данной области. CDR антитела могут быть идентифицированы как гипервариабельные области, впервые определенные Кэбатов и др. См., например, Kabat et al., 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC. Положения CDR могут быть также идентифицированы как структурные петли, впервые описанные Чотия и др. См., например, Chothia et al., *Nature* 342:877-883, 1989. Другие подходы к идентификации CDR включают «определение AbM», которое является компромиссом между нумерацией по Кэбату и Чотия и было получено с использованием программного обеспечения для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (в настоящее время эта программа называется Accelrys®), или «определение контактирования» CDR на основе наблюдаемых контактов с антигеном,

изложенное в публикации MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996. В другом подходе, упоминаемом здесь как «конформационное определение» CDR, положения CDR могут быть идентифицированы как остатки, которые вносят энтальпийные вклады в связывание с антигеном. См., например, Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283: 1156-1166, 2008. Другие определения границ CDR могут не строго следовать одному из вышеперечисленных подходов, но, тем не менее, будут перекрываться по меньшей мере с частью CDR по Кэбату, хотя они могут быть укорочены или удлинены исходя из предсказаний или на основе экспериментальных данных о том, что определенные остатки или группы остатков или даже полноразмерные CDR не существенно влияют на связывание с антигеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDR может относиться к CDR, определенным любым известным способом, включая комбинации этих способов. В способах согласно изобретению могут использоваться CDR, определенные в соответствии с любым из этих подходов. Для любого данного варианта осуществления изобретения, включающего более одной CDR, эти CDR могут быть определены в соответствии с любым из определений по Кэбату, по Чотию, по Кэбату и Чотию, по AbM, по контактированию и/или по конформации. Обычно, антитела содержат три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи или области CDR в варибельной области. CDR обеспечивают большинство контактирующих остатков для связывания антитела с антигеном или с эпитопом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, области CDR определены в соответствии с системой нумерации по Кэбату.

Используемый здесь термин «одноцепочечный варибельный фрагмент» или «scFv» относится к слитому белку варибельных областей тяжелой ( $V_H$ ) и легкой ( $V_L$ ) цепей иммуноглобулина (например, мышинового или человеческого), ковалентно связанных с образованием гетеродимера  $V_H::V_L$ . Тяжелая ( $V_H$ ) и легкая цепи ( $V_L$ ) либо соединены напрямую, либо соединены посредством пептид-содержащего линкера (например, из 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец  $V_H$  с C-концом  $V_L$  или C-конец  $V_H$  с N-концом  $V_L$ . Линкер обычно богат глицином, что придает ему гибкость, а также серином или треонином, что придает ему растворимость. Линкер может связывать варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров раскрыты в публикации Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) и в WO 2014/087010, содержание которых в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер представляет собой линкер G4S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, которая приводится ниже:

GGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 1]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, которая приводится ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS [SEQ ID NO: 2]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, которая приводится ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS [SEQ ID NO: 3]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, которая приводится ниже:

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS [SEQ ID NO: 4]

Используемый здесь термин «по существу идентичный» или «по существу гомологичный» относится к полипептиду или к молекуле нуклеиновой кислоты, которые по меньшей мере приблизительно на 50% идентичны или гомологичны эталонной аминокислотной последовательности (например, любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящей заявке) или эталонной последовательности нуклеиновой кислоты (например, любой из последовательностей нуклеиновых кислот, описанных в настоящей заявке). В некоторых вариантах осуществления изобретения, такая последовательность по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 99% или по меньшей мере приблизительно на 100% идентичны или гомологичны аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты, используемым для сравнения.

Идентичность последовательностей может быть оценена с помощью программы для анализа последовательностей (например, с помощью пакета программного обеспечения для анализа последовательностей Genetics Computer Group, Центра Биотехнологии Университета Висконсина, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST, BESTFIT, GAP или PILEUP/PRETTYBOX). Такое программное обеспечение позволяет сопоставлять идентичные или похожие последовательности путем присвоения степени гомологии различным заменам, делециям и/или другим модификациям. Консервативные замены обычно включают замены в следующих группах: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; и фенилаланин, тирозин. В репрезентативном подходе к определению степени идентичности может использоваться программа BLAST с оценкой вероятности от  $e^{-3}$  до  $e^{-100}$ , указывающей на близкородственную последовательность.

Процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Э. Мейерса и У. Миллера (Comput. Appl. Biosci.,

4:11-17 (1988)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием Таблицы весовых остатков PAM120, штрафа за длину пробела 12 и штрафа за пробел 4. Кроме того, процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью программы Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)), то есть, алгоритма, который был включен в программу GAP в программном пакете GCG (доступном на [www.gcg.com](http://www.gcg.com)), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и веса пробела 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Дополнительно или альтернативно, аминокислотные последовательности раскрытого в настоящей заявке предмета изобретения могут быть дополнительно использованы в качестве «последовательности запросов» для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для определения родственных последовательностей. Такой поиск может быть осуществлен с помощью программы XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиск белка BLAST может быть осуществлен с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные указанным последовательностям (например, последовательностям переменных областей тяжелой и легкой цепи scFv703), описанным в настоящей заявке. Для получения выравниваний с гэпами в целях сравнения может быть использована программа BLAST с пробелами, как описано в публикации Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При работе с программами BLAST и BLAST с пробелами могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Используемый здесь термин «консервативная модификация последовательности» относится к аминокислотной модификации, которая существенно не влияет на свойства или не изменяет свойства связывания раскрытого здесь CAR, нацеленного на CD19 (например, внеклеточного антигенсвязывающего домена CAR), и включающего аминокислотную последовательность. Консервативные модификации могут включать аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены во внеклеточный антигенсвязывающий домен раскрытого здесь CAR стандартными методами, известными специалистам в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Аминокислоты можно разделить на группы в соответствии с их физико-химическими свойствами, такими как заряд и полярность. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены аминокислотного остатка на аминокислоту из той же группы. Так, например, аминокислоты могут быть классифицированы по заряду: положительно заряженными аминокислотами являются лизин, аргинин, гистидин; отрицательно заряженными аминокислотами являются аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; нейтральными аминокислотами являются аланин, аспарагин, цистеин, глутамин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин. Кроме того, аминокислоты могут быть классифицированы по полярности: к полярным аминокислотам относятся аргинин (основные полярные), аспарагин, аспарагиновая кислота (кислотные

полярные), глутаминовая кислота (кислотные полярные), глутамин, гистидин (основные полярные), лизин (основные полярные), серин, треонин и тирозин; неполярными аминокислотами являются аланин, цистеин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин. Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в области CDR могут быть заменены другими аминокислотными остатками из той же группы, и измененное антитело может быть протестировано на сохранение функции (то есть, функций, указанных выше в пунктах (с)-(l)) с помощью описанных здесь функциональных анализов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, было модифицировано не более одного, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти остатков в указанной последовательности или в области CDR.

Используемый здесь термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для достижения благоприятного или желаемого клинического результата лечения. Эффективное количество может быть введено индивидууму в виде одной или нескольких доз. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для облегчения, ослабления, стабилизации, обратного развития или замедления прогрессирования заболевания или уменьшения патологических последствий заболевания каким-либо иным образом. Эффективное количество может быть определено врачом в каждом конкретном случае и находится в пределах компетенции специалиста в данной области. При определении подходящих доз для достижения эффективного количества обычно принимают во внимание несколько факторов. Такими факторами являются возраст, пол и масса индивидуума, состояние, подвергаемое лечению, тяжесть состояния, а также форма и эффективная концентрация вводимых клеток.

Используемый здесь термин «новообразование» относится к заболеванию, характеризующемуся патологической пролиферацией клеток или тканей и их последующей миграцией или инвазией в другие ткани или органы. Рост новообразования обычно является неконтролируемым и прогрессирующим и происходит в условиях, которые не вызывают или вызывают прекращение размножения нормальных клеток. Новообразование может поражать клетки, ткани или органы различных типов, включая, но не ограничиваясь ими, органы, выбранные из группы, состоящей из мочевого пузыря, кости, головного мозга, молочной железы, хряща, глии, пищевода, фаллопиевых труб, желчного пузыря, сердца, кишечника, почек, печени, легких, лимфатических узлов, нервной ткани, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, скелетных мышц, кожи, спинного мозга, селезенки, желудка, яичек, вилочковой железы, щитовидной железы, трахеи, мочеполового тракта, мочеочника, уретры, матки и влагалища, или ткани или клеток таких типов. Новообразования включают раковые заболевания, такие как саркомы, карциномы или плазмацитомы (злокачественные опухоли из плазматических клеток). Новообразование может представлять собой первичную опухоль или первичный рак.

Используемый здесь термин «сигнальная последовательность» или «лидерная последовательность» относится к пептидной последовательности (например, из 5, 10, 15, 20, 25 или 30 аминокислот), присутствующей на N-конце вновь синтезированных белков, которые направляют эти последовательности на секреторный путь.

Термины «содержит», «содержащий» имеют широкое значение, установленное в соответствии с патентным правом США, и могут означать «включает», «включающий» и т.п.

Используемый здесь термин «лечение» относится к клиническому вмешательству с целью изменить течение заболевания у индивидуума или клеток, подвергаемых лечению, и такое клиническое вмешательство может быть проведено либо для профилактики, либо во время течения клинической патологии. Терапевтические эффекты лечения включают, но не ограничиваются ими, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазов, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение состояния или паллиативное течение патологического состояния, и ремиссию или улучшение прогноза. В случае прекращения прогрессирования заболевания или расстройства, такое лечение может предотвратить ухудшение состояния, вызванное расстройством у индивидуума, страдающего заболеванием, или у индивидуума, у которого было диагностировано такое заболевание, или у индивидуума с подозрением на такое заболевание, но при этом, лечение может также предотвратить начало развития заболевания или симптома такого заболевания у индивидуума с риском развития такого заболевания или с подозрением на это заболевание.

Используемые здесь термины «индивидуум» или «субъект» относятся к позвоночным животным, таким как человек или животное, не являющееся человеком, например, млекопитающее. Млекопитающими являются, но не ограничиваются ими, человек, приматы, сельскохозяйственные животные, животные, участвующие в спортивных состязаниях, грызуны и домашние питомцы. Неограничивающими примерами животных, кроме человека, являются грызуны, таких как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; кролики; собаки; кошки; овцы; свиньи; козы; крупный рогатый скот; лошади; и приматы, кроме человека, такие как человекообразные обезьяны и мартышки.

## 5.2. CD19

CD19 представляет собой поверхностный клеточный гликопротеин с молекулярной массой 95 кДа, присутствующий на нормальных В-клетках с начала их развития до дифференцировки в плазматические клетки. CD19 отсутствует в других нормальных тканях, включая плюрипотентные стволовые клетки крови. Он экспрессируется при В-клеточных лимфомах, остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ), хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ), ретикулоэндотелиозе и в субпопуляции острых миелогенных лейкозов, что делает его привлекательной мишенью для иммунотерапии с

минимальным риском аутоиммунных заболеваний (кроме В-клеточной аплазии) или необратимой токсичности костного мозга.

CD19 является членом суперсемейства иммуноглобулинов и компонентом комплекса передачи сигнала на клеточной поверхности, который включает Leu13, CD81 и CD21, которые активируют передачу сигнала посредством В-клеточного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытый в настоящей заявке CAR связывается с человеческим CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, человеческий CD19 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности с регистрационным номером NCBI: NP\_001171569.1 (SEQ ID NO: 5) или ее фрагмента.

SEQ ID NO: 5 представлена ниже:

MPPPRLLFFL LFLTPMEVRP EEPLVVKVEE GDNVLQCLK GTSDGPTQQL  
TWSRESPLKP

FLKLSLGLPG LGIHRPLAI WLFIFNVSQQ MGGFYLCQPG PPSEKAWQPG  
WTVNVEGSGE

LFRWNVSDLG GLGCGLKNRS SEGPSSPSGK LMSPKLYVWA KDRPEIWEGE  
PPCLPPRDSL

NQSLSQDLTM APGSTLWLSC GVPPDSVSRG PLSWTHVHPK GPKSLLSLEL  
KDDRPARDMW

VMETGLLLPR ATAQDAGKYY CHRGNLTMSF HLEITARPVL WHWLLRTGGW  
KVSATLAYL

IFCLCSLVGI LHLQRALVLR RKRKRMTDPT RRFFKVTPPP GSGPQNQYGN  
VLSLPTPTSG

LGRAQRWAAG LGGTAPSYGN PSSDVQADGA LGSRSPPGVG PEEEEEGEGYE  
EPDSEEDSEF

YENDSNLGQD QLSQDGSQYE NPEDEPLGPE DEDSFSNAES YENEDDELTQ  
PVARTMDFLS

PHGSAWDPSR EATSLAGSQS YEDMRGILYA APQLRSIRGQ PGPNHEEDAD  
SYENMDNPDG

PDPAWGGGGR MGTWSTR [SEQ ID NO: 5]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, человеческий CD19 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности с регистрационным номером NCBI: NP\_001761.3 (SEQ ID NO: 6) или ее фрагмента.

SEQ ID NO: 6 представлена ниже:

MPPPRLLFFL LFLTPMEVRP EEPLVVKVEE GDNVLQCLK GTSDGPTQQL  
TWSRESPLKP

FLKLSLGLPG LGIHRPLAI WLFIFNVSQQ MGGFYLCQPG PPSEKAWQPG  
WTVNVEGSGE

LFRWNVSDLG GLGCGLKNRS SEGPSSPSGK LMSPKLYVWA KDRPEIWEGE  
PPCLPPRDSL



NQSLSQDLTM APGSTLWLSC GVPPDSVSRG PLSWTHVHPK GPKSLLSLEL  
KDDRPARDMW

VMETGLLLPR ATAQDAGKYY CHRGNLTMSF HLEITARPVL WHWLLRTGGW  
KVSATLAYL

IFCLCSLVGI LHLQRALVLR RKRKRMTDPT RRFFKVTPPP GSGPQNQYGN  
VLSLPTPTSG

LGRAQRWAAG LGGTAPSYGN PSSDVQADGA LGSRSPPGVG PEEEEGEGYE  
EPDSEEDSEF

YENDSNLGQD QLSQDGSQYE NPEDEPLGPE DEDSFSNAES YENEDEELTQ  
PVARTMDFLS

PHGSAWDPSR EATSLGSQSY EDMRGILYAA PQLRSIRGQP GPNHEEDADS  
YENMDNPDGP

DPAWGGGGRM GTWSTR [SEQ ID NO: 6]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR связывается с внеклеточным доменом CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR связывается с внеклеточным доменом CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный домен CD19 человека содержит или состоит из аминокислот с 20 по 291 SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный домен CD19 человека содержит аминокислоты или состоит из аминокислот с 20 по 291 SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CD19 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или по меньшей мере приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, или ее фрагменту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CD19 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или по меньшей мере приблизительно на 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, или ее фрагменту.

### ***5.3. Химерные антигенные рецепторы (CAR)***

CAR представляют собой сконструированные рецепторы, которые сообщают или придают представляющую интерес специфичность иммунной эффекторной клетке. CAR могут быть использованы для сообщения специфичности моноклонального антитела

клетке, например, иммунореактивной клетке, например, Т-клетке или NK-клетке; при этом, перенос их кодирующей последовательности облегчается ретровирусными векторами.

Существует три поколения CAR. CAR «первого поколения» обычно состоят из внеклеточного антигенсвязывающего домена (например, scFv), который слит с трансмембранным доменом, который, в свою очередь, связан с внутриклеточным сигнальным доменом. CAR «первого поколения» могут обеспечивать распознавание антигена *de novo* и вызывать активацию CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток посредством их сигнального домена цепи CD3ζ в одной слитой молекуле, независимо от HLA-опосредованной презентации антигена. CAR «второго поколения» добавляют внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы (включая, но не ограничиваясь ими, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40) к цитоплазматическому хвосту CAR для сообщения дополнительных сигналов клетке. CAR «второго поколения» включают последовательности, которые сообщают как костимуляцию (например, CD28 или 4-1BB), так и активацию (CD3ζ). CAR «третьего поколения» включают последовательности, которые обеспечивают множественную костимуляцию (например, CD28 и 4-1BB) и активацию (CD3ζ). В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR, нацеленный на CD19, представляет собой CAR первого поколения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR, нацеленный на CD19, не содержит внутриклеточного сигнального домена костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR, нацеленный на CD19, представляет собой CAR второго поколения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR, нацеленный на CD19, содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD19, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен слит с трансмембранным доменом, который связан с внутриклеточным сигнальным доменом.

### **5.3.1. Внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR**

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR содержит или представляет собой scFv. scFv может представлять собой человеческий scFv, гуманизованный scFv или мышиный scFv. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv представляет собой человеческий scFv. scFv может быть получен путем слияния вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антитела. Альтернативно или дополнительно, scFv может быть получен из Fab (вместо антитела, например, полученного из библиотеки Fab).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR содержит или представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fab является перекрестносшитым. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR

содержит или представляет собой  $F(ab)_2$ .

Любая из вышеуказанных молекул может быть включена в состав слитого белка с гетерологичной последовательностью для образования внеклеточного антигенсвязывающего домена CAR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывается с CD19 (например, CD19 человека) с константой диссоциации ( $K_d$ ), составляющей по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-6}$  М, по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М, по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М, по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М или по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывается с CD19 (например, CD19 человека) с константой диссоциации ( $K_d$ ) по меньшей мере приблизительно  $2 \times 10^{-8}$  М. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывается с CD19 (например, CD19 человека) с константой диссоциации ( $K_d$ ) от приблизительно  $2 \times 10^{-8}$  М до приблизительно  $8 \times 10^{-9}$  М.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывается с CD19 (например, с CD19 человека) с константой диссоциации ( $K_d$ ) от приблизительно 1 нМ до 50 нМ, приблизительно от 5 нМ до 30 нМ, приблизительно от 5 нМ до 25 нМ или приблизительно от 8 нМ до 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR связывается с CD19 (например, CD19 человека) с константой диссоциации ( $K_d$ ), составляющей по меньшей мере приблизительно 50 нМ, по меньшей мере приблизительно 40 нМ, по меньшей мере приблизительно 35 нМ, по меньшей мере приблизительно 30 нМ, по меньшей мере приблизительно 25 нМ, по меньшей мере приблизительно 20 нМ, по меньшей мере приблизительно 19 нМ, по меньшей мере приблизительно 18 нМ, по меньшей мере приблизительно 17 нМ, по меньшей мере приблизительно 16 нМ, по меньшей мере приблизительно 15 нМ, по меньшей мере приблизительно 14 нМ, по меньшей мере приблизительно 13 нМ, по меньшей мере приблизительно 12 нМ, по меньшей мере приблизительно 11 нМ, по меньшей мере приблизительно 10 нМ, по меньшей мере приблизительно 9 нМ, по меньшей мере приблизительно 8 нМ, по меньшей мере приблизительно 7 нМ, по меньшей мере приблизительно 6 нМ или по меньшей мере приблизительно 5 нМ.

Связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена CAR может быть подтверждено, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (РИА), FACS-анализа, биоанализа (например, на ингибирование роста) или Вестерн-блот-анализа. Каждый из этих анализов обычно позволяет определить присутствие представляющих особый интерес комплексов белок-антитело с использованием меченого реагента (например, антитела или scFv), специфичного для представляющего интерес комплекса. Так, например, scFv может быть радиоактивно помечен и использован в радиоиммуноанализе (РИА) (см., например,

публикацию Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March 1986, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). Радиоактивный изотоп может быть обнаружен с помощью таких средств, как использование гамма-счетчика или сцинтилляционного счетчика, или с помощью автордиографии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен, нацеленный на CD127, помечен флуоресцентным маркером. Неограничивающие примеры флуоресцентных маркеров включают белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра (GFP), белок, флуоресцирующий в синем диапазоне спектра (например, EBFP, EBFP2, Azurite и mKalamal), белок, флуоресцирующий в голубом диапазоне спектра (например, ECFP, Cerulean и CyPet) и белок, флуоресцирующий в желтом диапазоне спектра (например, ECFP, Cerulean и CyPet), например, YFP, Citrine, Venus и YPet). В некоторых вариантах осуществления изобретения, человеческий scFv, нацеленный на CD19, помечен GFP.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>H</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>H</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 7-9 представлены ниже.

SYGMH [SEQ ID NO: 7]

LIWYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 8]

PVEGLLRGFDY [SEQ ID NO: 9]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>H</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. Так, например, V<sub>H</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%,

приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. SEQ ID NO: 10 представлена ниже.

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVALIWY  
DGSNKYYADSVKGRFTI

SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPVEGLLRGFDYWGGQGLTVTVSS  
[SEQ ID NO: 10]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. SEQ ID NO: 11-13 представлены ниже.

RASQSVSSSYLA [SEQ ID NO: 11]

GASSRAT [SEQ ID NO: 12]

QQAGAVPIT [SEQ ID NO: 13]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14. Так, например,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 14. SEQ ID NO: 14 представлена ниже.

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA  
TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQAGAVPITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:  
14]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

$V_H$  и  $V_L$  могут быть связаны друг с другом, например, посредством линкера. Вариабельные области от N-конца до C-конца могут представлять собой или  $V_L$ - $V_H$  или  $V_H$ - $V_L$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  расположена на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, то есть,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к C-концу как  $V_L$ - $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который включает  $V_H$ , содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и  $V_L$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv включает  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ ,

содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15. SEQ ID NO: 15 представлена ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv против CD19 обозначается как «#2 scFv».

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA  
TGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQAGAVPITFGGGTKVEIKGGGGSGGG  
GSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAL  
IWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPVEGLLRGFD  
YWGQGTLLTVSS [SEQ ID NO: 15].

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. SEQ ID NO: 16 и 17 представлены ниже.

RASQSVRSSYLA [SEQ ID NO: 16]

QQLFDSPYT [SEQ ID NO: 17]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18. Так, например,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18. SEQ ID NO: 18 представлена ниже.

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA

TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQLFDSPYTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO: 18]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  расположена на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, то есть,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к С-концу как  $V_L - V_H$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который содержит  $V_H$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и  $V_L$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv включает  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной



в SEQ ID NO: 19. SEQ ID NO: 19 представлена ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv против CD19 обозначается как «#8 scFv».

IVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT  
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQLFDSPYTFGGGGTKVEIKGGGGSGGGG  
SGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVALI  
WYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPVEGLLRGFD  
YWGQGTLLTVSS [SEQ ID NO: 19]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21. SEQ ID NO: 20 и 21 представлены ниже.

GASRRAT [SEQ ID NO: 20]

QQAGIPPYT [SEQ ID: 21]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22. Так, например,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. SEQ ID NO: 22 представлена ниже.

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRA  
TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQAGIPPYTTFGGGGTKVEIK [SEQ ID NO:  
22]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1,

содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20 или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  расположена на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, то есть,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к C-концу как  $V_L$ - $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который содержит  $V_H$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и  $V_L$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv включает  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23. SEQ ID NO: 23 представлена ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv против CD19 обозначается как «#15 scFv».

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVALIWY

DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPVEGLLRGFDYW  
GQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA  
WYQQKPGQAPRL LIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQAGIPP  
YTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO: 23]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDR идентифицируют в соответствии с системой нумерации по Кэбату.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57. SEQ ID NO: 57 представлена ниже.

QQVDSLHPFT [SEQ ID NO: 57]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 58. Так, например, V<sub>L</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58. SEQ ID NO: 58 представлена ниже.

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRL LIYGASSRA  
TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQVDSLHPFTFGGGGTKVEIK [SEQ ID  
NO: 58]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>H</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  расположена на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, то есть,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к С-концу как  $V_L$ - $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который содержит  $V_H$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и  $V_L$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv включает  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv против CD19 обозначается как «#4 scFv».

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDR идентифицируют в соответствии с системой нумерации по Кэбату.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислоту последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59. SEQ ID NO: 59 представлена ниже.

QQAGGVPPLT [SEQ ID NO: 59]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 60. Так, например, V<sub>L</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60. SEQ ID NO: 60 представлена ниже.

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA  
TGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQAGGVPPLTFGGGTKVEIK [SEQ ID  
NO: 60]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>H</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; а V<sub>L</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>H</sub> включает CDR1, содержащую

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  расположена на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, то есть,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к C-концу как  $V_L$ - $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который содержит  $V_H$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и  $V_L$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv включает  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv против CD19 обозначается как «#5 scFv».

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDR идентифицируют в соответствии с системой нумерации по Кэбату.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61. SEQ ID NO: 61 представлена ниже.

QQAGVPPLT [SEQ ID NO: 61]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 62. Так, например,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62. SEQ ID NO: 62 представлена ниже.

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA  
TGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQAGVPPLTFGGGGTKVEIK [SEQ ID NO:  
62]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а  $V_L$  содержит аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  расположена на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, то есть,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к С-концу как  $V_L$ - $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который содержит  $V_H$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и  $V_L$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv включает  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv против CD19 обозначается как «#6 scFv».

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDR идентифицируют в соответствии с системой нумерации по Кэбату.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63. SEQ ID NO: 63 представлена ниже.

QQAGGVPPFT [SEQ ID NO: 63]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64. Так, например,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%,



приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64. SEQ ID NO: 64 представлена ниже.

EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR  
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQAGGVPPFTFGGGGTKVEIK [SEQ ID NO: 64]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  расположена на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, то есть,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к C-концу как  $V_L$ - $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который содержит  $V_H$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и  $V_L$ , включающую CDR1,

содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv включает V<sub>H</sub>, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и V<sub>L</sub>, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv против CD19 обозначается как «#7 scFv».

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDR идентифицируют в соответствии с системой нумерации по Кэбату.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66. SEQ ID NO: 66 и 67 представлены ниже.

GASNRAT [SEQ ID NO: 65]

QQAGVFPFT [SEQ ID NO: 66]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% (например, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67. Так, например, V<sub>L</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>L</sub> содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67. SEQ ID NO: 67 представлена ниже.

EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNR

ATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQAGVFPFTFGGGGTKVEIK [SEQ ID NO: 67]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11 или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65 или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66, или ее консервативную модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а  $V_L$  включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_L$  расположена на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, то есть,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к С-концу как  $V_L$ - $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который содержит  $V_H$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; и  $V_L$ , включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv включает  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и  $V_L$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv против CD19 обозначается как «#1 scFv».

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDR идентифицируют в соответствии с системой нумерации по Кэбату.

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, представлена в SEQ ID NO: 68. SEQ ID NO: 68 приводится ниже.

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG  
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTGATATGGTATGATGGA  
AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA  
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGG  
TGTAATACTGCGCCAAGCCAGTGGAAAGGACTATTAAGAGGATTTCGATTACTGGGGA  
CAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 68]

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, представлена в SEQ ID NO: 69. SEQ ID NO: 69 приводится ниже.

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA  
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG  
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGCCGG  
AGCCGTCCCTATCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA [SEQ ID NO: 69]

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, представлена в SEQ ID NO: 70. SEQ ID NO: 70 приводится ниже.

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA  
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGGAGCAGCTACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG  
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGCTCTTC  
GACAGTCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA [SEQ ID NO: 70]

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, представлена в SEQ ID NO: 71. SEQ ID NO: 71 приводится ниже.

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA  
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGAAGG  
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGCCGGC  
ATCCCCCTTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA [SEQ ID NO: 71]

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, представлена в SEQ ID NO: 72. SEQ ID NO: 72 приводится ниже.

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA  
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG  
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGTCGAC  
AGTCTCCATCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA [SEQ ID NO:  
72]

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая  
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, представлена в SEQ ID NO: 73. SEQ  
ID NO: 73 приводится ниже.

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA  
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG  
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGCCGG  
AGGCGTCCCTCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA [SEQ ID  
NO: 73]

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая  
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, представлена в SEQ ID NO: 74. SEQ  
ID NO: 74 приводится ниже.

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA  
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGGAGCAGCTACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG  
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGCCGG  
AGTCCCCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA [SEQ ID NO: 74]

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая  
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, представлена в SEQ ID NO: 75. SEQ  
ID NO: 75 приводится ниже.

GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA  
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG  
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGCCGG  
AGGCGTCCCTCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA [SEQ ID  
NO: 75]

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая  
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, представлена в SEQ ID NO: 76. SEQ

ID NO: 76 приводится ниже.

GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA  
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAACAGG  
GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGCCGG  
AGTCTTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA [SEQ ID NO: 76]

В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  и  $V_L$  связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

Аминокислотные последовательности  $V_H$  и/или  $V_L$ , которые по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95% (например, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99%) гомологичны или идентичны конкретной последовательности (например, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 67), могут содержать замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции по сравнению с указанной(ыми) последовательность(ями), но сохраняют способность связываться с антигеном-мишенью (например, мезотелином). В некоторых вариантах осуществления изобретения, в конкретной последовательности (например, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 67) заменено, вставлено и/или удалено от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, замены, инсерции или делеции присутствуют в областях за пределами CDR (например, в FR) внеклеточного антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит последовательность  $V_H$  и/или  $V_L$ , выбранную из SEQ ID NO: 10, 14, 18, 22, 59, 61, 63, 65 и 68, включая посттрансляционные модификации SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 67.

Кроме того, внеклеточный антигенсвязывающий домен может содержать лидерный

или сигнальный пептид, который направляет формирующийся белок в эндоплазматический ретикулум. Сигнальный пептид или лидерный пептид может быть необходим в том случае, если CAR должен быть гликозилирован и заякорен в клеточной мембране. Сигнальная последовательность или лидерная последовательность может представлять собой пептидную последовательность (длиной приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25 или приблизительно 30 аминокислот), присутствующую на N-конце вновь синтезированных белков, которые направляют ее на секреторный путь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид ковалентно присоединен к 5'-концу (N-концу) внеклеточного антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид содержит полипептид CD8, например, CAR содержит усеченный сигнальный пептид CD8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид образуется из антитела, от которого он происходит. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид для #2 scFv представлен в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид для #8 scFv представлен в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальный пептид для #15 scFv представлен в SEQ ID NO: 55.

MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRC [SEQ ID NO: 54]

MEFGLSWVFLVALLRGVQC [SEQ ID NO: 55]

### **5.3.2. Трансмембранный домен CAR**

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR содержит гидрофобную альфа-спираль, которая охватывает по меньшей мере часть мембраны. Различные трансмембранные домены сообщают рецепторам различные стабильности. После распознавания антигена происходит кластеризация рецепторов и сигнал передается в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR содержит нативный или модифицированный трансмембранный домен CD8, CD28, CD3 $\zeta$ , CD4, 4-1BB, OX40, ICOS, CD84, CD166, CD8a, CD8b, ICAM-1, CTLA-4, CD27, CD40, NKGD2 или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 или его часть). В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR содержит трансмембранный домен CD28 человека или его часть. Полипептид CD28 может содержать аминокислотную последовательность или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, имеющей регистрационный номер NCBI: NP\_006130 (SEQ ID NO: 24), или ее фрагменту, и/или может, но необязательно, содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая является частью последовательности SEQ ID NO: 24, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, или по меньшей мере приблизительно 60, и/или до приблизительно 70, до приблизительно 80, до приблизительно 90, до приблизительно 100, до приблизительно 150, до приблизительно 200 или до приблизительно 220 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности длиной от 1 до 220, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 154 до 179, от 150 до 200, от 153 до 179 или от 200 до 220 аминокислот SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28, включающий аминокислотную последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности длиной от 154 до 179 аминокислот SEQ ID NO: 24. SEQ ID NO: 24 представлена ниже.

MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE  
FRASLHKGLD

SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY  
FCKIEVMYPP

PYLDNEKSNG TTHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV  
TVAFHFWVR

SKRSRLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 24]

Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность из аминокислот со 154 по 179 SEQ ID NO: 24, представлена ниже как SEQ ID NO: 25.

TGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGTTGCTAGTAACA  
GTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG [SEQ ID NO: 25]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR содержит трансмембранный домен мышинового CD28 или его часть. Полипептид CD28 может состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или 100% идентична или гомологична последовательности, имеющей регистрационный номер NCBI: NP\_031668.3 (SEQ ID No: 26) или ее фрагменту, и/или может, но необязательно, содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая является частью последовательности SEQ ID NO: 26, длина которой составляет по меньшей мере



приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50 и приблизительно до 218 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, длина которой составляет от 1 до 218, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 200, от 151 до 177 или от 200 до 218 аминокислот SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR включает полипептид CD28, содержащий аминокислотную последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности длиной от 151 по 177 аминокислот SEQ ID NO: 26. SEQ ID NO: 26 представлена ниже:

MTLRLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSLS CRYSYNLLAK  
EFRASLYKGV

NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FDNETHVTFRL WNLHVNHTDI  
YFCKIEFMYP

PPYLDNERSN GTPIHKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV  
ALCVIWTNSR

RNRLQLSDYM NMTPRRPGLT RKPYPYAPA RDFAAYRP [SEQ ID NO: 26]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD8 (например, трансмембранный домен CD8 или его часть). В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR содержит трансмембранный домен человеческого CD8 или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD8 содержит аминокислотную последовательность или имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична последовательности, имеющей регистрационный номер NCBI: NP\_001139345.1 (SEQ ID NO: 27), или ее фрагменту, и/или может, но необязательно, содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD8 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая является частью последовательности SEQ ID NO: 27, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50 и приблизительно до 235 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD8 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности длиной от 1 до 235, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 200, от 137 до 209 или от 200 до 235 аминокислот SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR включает полипептид CD8, содержащий аминокислотную

последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности длиной от 137 по 209 аминокислот SEQ ID NO: 27. SEQ ID NO: 27 представлена ниже.

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCS  
WLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYP  
CSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR  
GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARY  
V [SEQ ID NO: 27]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR содержит трансмембранный домен мышинового CD8 или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD8 содержит или имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична последовательности, имеющей регистрационный номер NCBI: AAA92533.1 (SEQ ID NO: 28), или ее фрагменту, и/или может, но необязательно, содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD8 содержит или имеет аминокислотную последовательность, которая является частью последовательности SEQ ID NO: 28, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, или по меньшей мере приблизительно 60, или по меньшей мере приблизительно 70, или по меньшей мере приблизительно 100, или по меньшей мере приблизительно 200 и до 247 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD8 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности длиной от 1 до 247, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 200, от 151 до 219 или от 200 до 247 аминокислот SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансмембранный домен CAR включает полипептид CD8, содержащий аминокислотную последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности длиной от 151 по 219 аминокислот SEQ ID NO: 28. SEQ ID NO: 28 представлена ниже.

MASPLTRFLS LNLLLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD  
LVCEVLGSVS

QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNKI TWDEKLNSSK LFS AVRDTNN  
KYVLTLNKFS

KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTTKPVLRT PSPVHPTGTS  
QPQRPEDCRP

RGSVKGTGLD FACDIYIWAP LAGICVAPLL SLIITLICYH RSRKRVCKCP  
RPLVRQEGKP

RPSEKIV [SEQ ID NO: 28]

В некоторых неограничивающих вариантах осуществления изобретения, CAR дополнительно содержит спейсерную область, которая связывает внеклеточный антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом. Спейсерная область может быть достаточно гибкой, что позволяет антигенсвязывающему домену ориентироваться в разных направлениях и облегчает распознавание антигена при сохранении активирующей активности CAR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирная/спейсерная область CAR содержит нативную или модифицированную шарнирную область CD8, CD28, CD3 $\zeta$ , CD40, 4-1BB, OX40, CD84, CD166, CD8a, CD8b, ICOS, ICAM-1, CTLA-4, CD27, CD40, NKGD2 или их комбинации. Шарнирная/спейсерная область может представлять собой шарнирную область IgG1 или область CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> иммуноглобулина и части CD3, часть полипептида CD28 (например, часть SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26), часть полипептида CD8 (например, часть SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28), и варианты любых из вышеперечисленных областей, которые по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или по меньшей мере приблизительно на 100% идентичны или гомологичны этим последовательностям, или синтетическую спейсерную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирный домен CAR содержит нативную или модифицированную шарнирную область CD28. В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирный домен CAR содержит нативную шарнирную область CD28. В некоторых вариантах осуществления изобретения, шарнирный домен CAR содержит аминокислотную последовательность длиной от 114 по 153 аминокислот SEQ ID NO: 24. Репрезентативная нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность длиной от 114 по 153 аминокислот SEQ ID NO: 24, представлена ниже как SEQ ID NO: 56.

ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAA  
CCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTT  
CTAAGCCCTTT [SEQ ID NO: 56]

### ***5.3.3. Внутриклеточный сигнальный домен CAR***

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит полипептид CD3 $\zeta$ . CD3 $\zeta$  может активировать или стимулировать клетку (например, клетку лимфоидного происхождения, например, Т-клетку). CD3 $\zeta$  дикого типа («нативный») включает три функциональных мотива активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM), три функциональных области, состоящих из богатых основаниями фрагментов (BRS) (BRS1, BRS2 и BRS3). CD3 $\zeta$  передает сигнал активации клетке (например, клетке лимфоидного происхождения, например, Т-клетке) после связывания антигена. Внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ -цепи является первым передатчиком сигналов от эндогенных TCR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит нативный CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, нативный CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, имеющей регистрационный номер NCBI: NP\_932170 (SEQ ID NO: 29), или ее фрагменту, и/или может, но необязательно, содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая является частью последовательности SEQ ID NO: 29, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50 и приблизительно до 164 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нативный CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности длиной от 1 до 164, от 1 до 50, от 50 до 100, от 52 до 164, от 100 до 150 или от 150 до 164 аминокислот SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR включает нативный CD3 $\zeta$ , содержащий аминокислотную последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности длиной от 52 до 164 аминокислот SEQ ID NO: 29. SEQ ID NO: 29 представлена ниже:

MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF  
LRVKFSRSAD

APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGL  
YNELQKDKMA

EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID  
NO: 29]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нативный CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30. SEQ ID NO: 30 представлена ниже:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN  
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP  
PR [SEQ ID NO: 30]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный

домен CAR содержит модифицированный полипептид CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит один, два или три ITAM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит нативный ITAM1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нативный ITAM1 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31.

QNQLYNELNLGRREEYDVLDKR [SEQ ID NO: 31]

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, представлена ниже в SEQ ID NO: 32.

CAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT  
GTTTTGGACAAGAGA [SEQ ID NO: 32]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  включает вариант ITAM1, содержащий одну или несколько мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM1 содержит две мутации с потерей функции или состоит из них. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждая одна или более (например, две) мутации с потерей функции включает мутацию остатка тирозина в ITAM1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM1 состоит из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM1 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной ниже в SEQ ID NO: 33.

QNQLFNELNLGRREEFDVLDKR [SEQ ID NO: 33]

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, представлена ниже в SEQ ID NO: 34.

CAGAACCAGCTCTTTAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTTTCGATG  
TTTTGGACAAGAGA [SEQ ID NO: 34]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит нативный ITAM2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нативный ITAM2 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной ниже в SEQ ID NO: 35.

QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK [SEQ ID NO: 35]

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, представлена ниже в SEQ ID NO: 36.

CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC  
AGTGAGATTGGGATGAAA [SEQ ID NO: 36]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  включает вариант ITAM2. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, вариант ITAM2 содержит одну или более мутаций с потерей функции или состоит из них. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM2 содержит две мутации с потерей функции или состоит из них. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждая из одной или более (например, двух) мутаций с потерей функции включает мутацию остатка тирозина в ITAM2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM1 состоит из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM2 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной ниже в SEQ ID NO: 37.

QEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMK [SEQ ID NO: 37]

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, представлена ниже в SEQ ID NO: 38.

CAGGAAGGCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCA  
GTGAGATTGGGATGAAA [SEQ ID NO: 38]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит нативный ITAM3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нативный ITAM3 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной ниже в SEQ ID NO: 39.

HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ [SEQ ID NO: 39]

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, представлена ниже в SEQ ID NO: 40.

CACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACG  
CCCTTCACATGCAG [SEQ ID NO: 40]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит вариант ITAM3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM3 содержит две мутации с потерей функции или состоит из них. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждая из одной или более (например, двух) мутаций с потерей функции включает мутацию остатка тирозина в ITAM3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM3 содержит две мутации с потерей функции или состоит из них. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вариант ITAM3 содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной ниже в SEQ ID NO: 41.

HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ [SEQ ID NO: 41]

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, представлена ниже в SEQ ID NO: 42.

CACGATGGCCTTTTCAGGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGC

CSTTCACATGCAG [SEQ ID NO: 42]

Различные модифицированные полипептиды CD3 $\zeta$  и CAR, содержащие модифицированные полипептиды CD3 $\zeta$ , раскрыты в публикации Международной патентной заявки № WO 2019/133969, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR включает модифицированный полипептид CD3 $\zeta$ , содержащий нативный ITAM1, вариант ITAM2, содержащий одну или более (например, две) мутаций с потерей функции или состоящий из них, и вариант ITAM3, содержащий одну или более (например, две) мутаций с потерей функции или состоящий из них. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит модифицированный полипептид CD3 $\zeta$ , включающий нативный ITAM1, вариант ITAM2, состоящий из двух мутаций с потерей функции, и вариант ITAM3, состоящий из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR включает модифицированный полипептид CD3 $\zeta$ , содержащий нативный ITAM1, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31, вариант ITAM2, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, и вариант ITAM3, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR обозначен как «1XX». В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43. SEQ ID NO: 43 представлена ниже:

RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPENGGKPR  
RKNPQEGLFN ELQKDKMAEA FSEIGMKGER RRGKGHDGLF QGLSTATKDT  
FDALHMQALP PR [SEQ ID NO: 43]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR включает модифицированный полипептид CD3 $\zeta$ , содержащий аминокислотную последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%, по меньшей мере приблизительно на 100% идентична SEQ ID NO: 43 или ее фрагменту и/или может, но необязательно, содержать одну или две или три консервативных аминокислотных замены.

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, представлена ниже в SEQ ID NO: 44.

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG

AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA  
CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT  
CAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGA  
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGG  
GGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCC  
CTCGC [SEQ ID NO: 44]

Другая репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, представлена ниже в SEQ ID NO: 45.

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG  
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA  
CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT  
CAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGA  
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGG  
GTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCC  
CTCGC [SEQ ID NO: 45]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR дополнительно содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна костимулирующая область содержит костимулирующую молекулу или ее часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна костимулирующая область содержит внутриклеточный домен по меньшей мере одной костимулирующей молекулы или ее части.

Используемый здесь термин «костимулирующая молекула» относится к молекуле клеточной поверхности, которая отличается от антигенного рецептора или его лиганда, и которая может обеспечивать эффективный ответ лимфоцитов на антиген. В некоторых вариантах осуществления изобретения, костимулирующая молекула может обеспечивать оптимальную активацию лимфоцитов. Неограничивающие примеры костимулирующих молекул включают CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, DAP-10 и их комбинации. Костимулирующая молекула может связываться с костимулирующим лигандом, представляющим собой белок, экспрессируемый на клеточной поверхности, который при связывании с его рецептором вызывает костимулирующий ответ, то есть, внутриклеточный ответ, который влияет на стимуляцию, обеспечиваемую в том случае, если антиген-распознающий рецептор (например, химерный антигенный рецептор (CAR)) связывается со своим антигеном-мишенью. Так, например, лиганд 4-1BB (то есть, 4-1BBL) может связываться с 4-1BB для обеспечения внутриклеточного сигнала, который в сочетании с сигналом CAR индуцирует эффекторную функцию CAR<sup>+</sup>-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28 или его часть, внутриклеточный домен 4-1BB или его часть, внутриклеточный



домен OX40 или его часть, внутриклеточный домен ICOS или его часть, или внутриклеточный домен DAP-10 или его часть.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид CD28, например, внутриклеточный домен CD28 или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит внутриклеточный домен человеческого CD28 или его часть.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28, содержащийся в костимулирующей сигнальной области CAR, включает аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%, по меньшей мере приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, или ее фрагменту, и/или может, но необязательно, содержать одну, или две, или три консервативных аминокислотных замены. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28, содержащийся в костимулирующей сигнальной области, содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая является частью последовательности SEQ ID NO: 24, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40 или по меньшей мере приблизительно 50 и приблизительно до 220 аминокислот. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28, содержащийся в костимулирующей сигнальной области, содержит аминокислоты или состоит из аминокислот от 1 до 220, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 114 до 220, от 150 до 200, 180. до 220 или от 200 до 220 SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая включает полипептид CD28, содержащий аминокислотную последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности, длина которой составляет от 180 до 220 аминокислот SEQ ID NO: 24.

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность аминокислот 180-220 SEQ ID NO: 24, представлена ниже в SEQ ID NO: 46.

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCC  
GCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG  
CAGCCTATCGCTCC [SEQ ID NO: 46]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный

домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит внутриклеточный домен мышинового CD28 или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28, содержащийся в костимулирующей сигнальной области, включает аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%, или по меньшей мере приблизительно на 100% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 26, или ее фрагменту, и/или может, но необязательно, содержать одну, или две, или три консервативных аминокислотных замены. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28, содержащийся в костимулирующей сигнальной области, содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая является частью последовательности SEQ ID NO: 26, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40 или по меньшей мере приблизительно 50 и приблизительно до 218 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид CD28, содержащийся в костимулирующей сигнальной области, содержит аминокислоты или состоит из аминокислот от 1 до 218, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 218, от 178 до 218, или от 200 до 218 SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточная сигнальная область CAR согласно изобретению содержит полипептид CD28, включающий аминокислотную последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности, длина которой составляет от 178 до 218 аминокислот SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид 4-1BB, например, внутриклеточный домен 4-1BB или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения, костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный домен человеческого 4-1BB или его часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 4-1BB, содержащийся в костимулирующей сигнальной области, содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%, по меньшей мере приблизительно на 100% идентична или гомологична последовательности, имеющей регистрационный номер NCBI №: NP\_001552 (SEQ ID NO: 47) или ее фрагменту, и/или может, но необязательно, содержать одну, или две, или три консервативных аминокислотных замены. В некоторых вариантах

осуществления изобретения, 4-1BB, содержащийся в костимулирующей сигнальной области, содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, которая является частью последовательности SEQ ID NO: 47, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, и/или приблизительно до 50, приблизительно до 60, приблизительно до 70, приблизительно до 80, приблизительно до 90, приблизительно до 100, приблизительно до 200, или приблизительно до 255 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид 4-1BB, содержащийся в костимулирующей сигнальной области, включает аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, длина которой составляет от 1 до 255, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 200 или от 200 до 255 аминокислот SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления изобретения, костимулирующая сигнальная область содержит полипептид 4-1BB, включающий аминокислотную последовательность или состоящий из аминокислотной последовательности длиной от 214 до 255 аминокислот SEQ ID NO: 46. SEQ ID NO: 47 представлена ниже.

MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP  
NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS  
MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG  
TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLT LRF  
SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE GGCEL [SEQ ID NO: 47]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая включает внутриклеточные домены двух или более костимулирующих молекул или их частей, например, внутриклеточный домен CD28 или его часть и внутриклеточный домен 4-1BB или его часть, или внутриклеточные домены CD28 или его часть и внутриклеточный домен OX40 или его часть.

#### **5.3.4. Репрезентативные CAR**

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR включает (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i)  $V_H$ , содержащий CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и (ii)  $V_L$ , содержащий CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, (b) шарнирный домен, содержащий полипептид CD28 (например, шарнирный домен человеческого CD28 или его часть, например, полипептид CD28, состоящий из аминокислотной последовательности, длина которой составляет от 114 до 153 аминокислот SEQ ID NO: 24);

(с) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен человеческого CD28 или его часть, например, полипептид CD28, состоящий из аминокислотной последовательности длиной от 154 до 179 аминокислот SEQ ID NO: 24), и (d) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 $\zeta$  (например, модифицированный полипептид человеческого CD3 $\zeta$ , например, полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43), и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен человеческого CD28 или его часть, например, полипептид CD28, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 длиной 180-220 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> связаны посредством линкера, состоящего из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> расположены от N-конца к С-концу как V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR обозначен как «CAR#2». В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную ниже в SEQ ID NO: 48.

MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRCEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSY  
LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQAG  
AVPITFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF  
SSYGMHWVRQAPGKGLEWVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL  
RAEDTAVYYCAKPVEGLLRGFDYWQGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIH  
VKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLHSDYMN  
MTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE  
YDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGFLNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDG  
LFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR [SEQ ID NO: 48]

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, представлена ниже в SEQ ID NO: 49:

ATGGATATGAGAGTACCAGCTCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTTTTGTGGTTGCC  
GGACACACGCTGTGAGATTGTCCTGACTCAGTCTCCCGGGACTCTGTCCCTCAGCCC  
CGGTGAACGCGCTACCCTTTTCATGCAGAGCCTCTCAGTCTGTGTCCAGCAGCTACCT  
CGCATGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCTCCCAGGCTGTTGATCTATGGAGCTA  
GTAGTCGAGCAACAGGCATCCCAGATCGCTTCTCAGGGAGCGGTTTACAGGTACAGAC  
TTCACGCTGACGATTTCAAGGCTGGAACCCGAAGATTTTGCCGTCTATTATTGTCAA  
CAGGCAGGGGCTGTGCCAATCACTTTCGGGGGCGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGG  
AGGCGGAGGAAGTGGAGGAGGAGGGAGCGGTGGAGGAGGGTCACAGGTGCAGCTG  
GTAGAATCTGGCGGAGGGGTCGTTCAACCAGGGAGGTCATTGCGGTTGAGCTGCGC  
AGCGAGTGGTTTTACCTTCAGCAGTTATGGAATGCATTGGGTGAGACAAGCACCAG  
GAAAAGGTCTGGAGTGGGTGGCTTTGATTTGGTACGACGGCAGTAATAAATACTAC  
GCCGATTCTGTAAAGGGCAGATTTACTATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTG

TACCTGCAGATGAACTCTCTGAGAGCCGAAGATACAGCAGTGTACTATTGTGCTAAG  
 CCCGTAGAAGGGCTCCTGAGGGGATTCGATTATTGGGGCCAGGGTACGCTTGTGAC  
 AGTGTCTAGTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAA  
 TGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTC  
 CCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCT  
 GGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAA  
 GAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGC  
 CCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCT  
 CCAGAGTGAAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAAC  
 CAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAA  
 GAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG  
 GAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGAT  
 TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGTC  
 TCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTC  
 GC [SEQ ID NO: 49]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR включает (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i)  $V_H$ , содержащий CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и (ii)  $V_L$ , содержащий CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17, (b) шарнирный домен, содержащий полипептид CD28 (например, шарнирный домен человеческого CD28 или его часть, например, полипептид CD28, состоящий из аминокислотной последовательности, длина которой составляет от 114 до 153 аминокислот SEQ ID NO: 24); (c) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен человеческого CD28 или его часть, например, полипептид CD28, состоящий из аминокислотной последовательности длиной от 114 до 179 аминокислот SEQ ID NO: 24), и (d) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 $\zeta$  (например, модифицированный полипептид человеческого CD3 $\zeta$ , например, полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43), и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен человеческого CD28 или его часть, например, полипептид CD28, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 длиной 180-220 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  и  $V_L$  связаны посредством линкера, состоящего из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к C-концу:  $V_L$  -  $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления

изобретения, CAR обозначен как «CAR#8». В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную ниже в SEQ ID NO: 50.

MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRCEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSSY  
LAWYQ  
QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQLFDSPYT  
FGGGTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYG  
MH  
WVRQAPGKGLEWVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA  
VYY  
CAKPEGLLRGFDYWGGQGLTVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP  
P  
LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR  
K  
HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR  
DPE  
MGGKPRRKNPQEGFLNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTF  
DAL HMQALPPR [SEQ ID NO: 50]

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, представлена ниже в SEQ ID NO: 51.

atggatatgagagtagcagctcagctgctggcctgctgctttgtggtgccggacacacgctgtgagattgtgctgacacagtc  
tccaggcacactctcccttagccggcgagagggccactctgagctgtcggttagtcagtcagtaaggagctcttatctggcctggatc  
agcagaaaccaggggcaggctccaaggctgcttatctacggtgcaagttcccggaacaggcatcccagatcgctttagcggtagcggg  
agtgggaccgatttcactctgacctctcccgcttgagcccgaggatttcgctgtctattatgccagcaactgttgactcacctatacgttc  
ggtggagggaacaaagtggagatcaaggaggcgagggaagtggaggaggaggagcggtggaggagggtcacaggtgcagctg  
gtagaatctggcgagggggtgtcaaccaggggaggtcattgcggtgagctgcgcagcgagtggtttaccttcagcagttatggaatga  
ttgggtgagacaagcaccaggaaaaggctggagtggtggctttgatttggtacgacggcagtaataaatactacgccgattctgttaagg  
gcagatttactatttctcgcgacaacagcaagaacacgctgtacctgcagatgaactctctgagagccgaagatacagcagtgactattgtg  
ctaagcccgtagaagggtcctgaggggattcgattattggggccagggtacgcttgtagcagtgcttagtcggggcgccgcaattgaagt  
tatgtatcctcctctacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaacacctttgtccaagtcacctatttcccg  
gaccttctaagcccttttgggtgctggtggtggtgggtggagtcctggcttgcctatagcttgcctagtaaacagtggcctttatttttctgggtgag  
gagtaaggaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccggggcccccgaagcattaccagccctatg  
ccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcaggggccagaacca  
gctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagc  
cgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggccttcagtgcagattgggatgaaaggc  
gagcggcgagggggaaggggcacgatggccttttcagggggctcagtagccaccaaggacaccttcgacgcccttcacatgcagg  
ccctgccccctcgc [SEQ ID NO: 51]

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR включает (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V<sub>H</sub>, содержащий CDR1,

состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и (ii)  $V_L$ , содержащий CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21, (b) шарнирный домен, содержащий полипептид CD28 (например, шарнирный домен человеческого CD28 или его часть, например, полипептид CD28, состоящий из аминокислотной последовательности, длина которой составляет от 114 до 153 аминокислот SEQ ID NO: 24); (c) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен человеческого CD28 или его часть, например, полипептид CD28, состоящий из аминокислотной последовательности длиной от 114 до 179 аминокислот SEQ ID NO: 24), и (d) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 $\zeta$  (например, модифицированный полипептид человеческого CD3 $\zeta$ , например, полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43), и (ii) костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен человеческого CD28 или его часть, например, полипептид CD28, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 длиной 180-220 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  и  $V_L$  связаны посредством линкера, состоящего из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения,  $V_H$  и  $V_L$  расположены от N-конца к C-концу:  $V_L$  -  $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR обозначен как «CAR#15». В некоторых вариантах осуществления изобретения, CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную ниже в SEQ ID NO: 51.

```
MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM
HWVRQAP
GKGLEWVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
PVE
GLLRGFDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA
S
QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV
YYCQQAGIPPYTFGGGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFLP
GPSKPFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQ
PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGG
KPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALH
MQ
```

## ALPPR [SEQ ID NO: 52]

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, представлена ниже в SEQ ID NO: 53.

atggaattcggcttgcattgggtgttcctcgtcgcgtgctgcgcggcgttcagtgccaggtgcagctggtagaatctggcggag  
gggtcgttcaaccagggaggtcattgcgggtgagctgcgcagcgagtggttttaccttcagcagttatggaatgcattgggtgagacaagca  
ccaggaaaaggctcggagtggtggctttgatttggtagcagggcagtaataaatactacgccgattctgttaagggcagatttactattctc  
gcgacaacagcaagaacacgctgtacctgcagatgaactctctgagagccgaagatacagcagtgactattgtgctaagcccgtagaag  
ggctcctgaggggattcgattattggggccagggtacgcttgacagtgcttagtgaggcggagggaagtggaggaggaggaggagcggg  
ggaggaggggcagaaatcgtgctcaccagtcgccgggaacactgagtcctctccaggggaagagcaacattgtcctgcagagcatcc  
cagagcgtgagctccagctacctgcctgggtatcagcagaaccaggccaggcaccccgctgcttatctacgggtgcatccaggagagcc  
actgggatccccgatcgattctctggatcagggtctggcactgactttacattgacgatctcacggctggaacccgaggatttcgccgtgatt  
actccaacagggccgaattccaccgtatacttcggaggaggtactaaagtagagattaaacggggcggccgaattgaagtattgatcct  
cctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaacacctttgtccaagtcacctatttccggaccttcta  
agcccttttgggtgctgggtgggtgggtggagtcctggcttctatagcttgcagtaacagtgccctttattattttctgggtgaggagtaaga  
ggagcaggtcctcgcacagtgcactacatgaacatgactccccgccggccggcccccacccgcaagcattaccagccctatgccccacca  
cgcgacttcgcagcctatcgtccagagtgaagttcagcaggagcgcagacggcccgctaccagcaggggccagaaccagctctataa  
cgagctcaatctaggacgaagagaggagtagcatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaag  
gaagaacctcaggaaggcctgtcaatgaactgcagaaagataagatggcgaggccttcagtgagattgggatgaaaggcgagcggc  
ggaggggcaaggggcacgatggcctttccaggggctcagtacagccaccaaggacaccttcgacggccttcacatgcaggccctgccc  
cctcgc [SEQ ID NO: 53]

**5.4. КЛЕТКИ**

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к клеткам, содержащим раскрытый здесь CAR, нацеленный на CD19 (например, раскрытый в Разделе 5.3). В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка выбрана из группы, состоящей из клеток лимфоидного происхождения и клеток миелоидного происхождения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой иммунореактивную клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунореактивная клетка представляет собой клетку лимфоидного происхождения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой клетку лимфоидного происхождения. Клетки лимфоидного происхождения могут обеспечивать выработку антител, регуляцию клеточной иммунной системы, обнаружение чужеродных агентов в крови, обнаружение чужеродных для хозяина клеток и т.п. Неограничивающие примеры клеток лимфоидного происхождения включают Т-клетки, природные клетки-киллеры (NK), В-клетки, дендритные клетки и стволовые клетки, из которых могут быть дифференцированы лимфоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (например, эмбриональную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой Т-



клетку. Т-клетки могут представлять собой лимфоциты, которые созревают в тимусе и в основном ответственны за клеточно-опосредованный иммунитет. Т-клетки участвуют в адаптивной иммунной системе. Т-клетки согласно изобретению могут представлять собой Т-клетки любого типа, включая, но не ограничиваясь ими, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти (включая центральные Т-клетки памяти), Т-клетки памяти, подобные стволовым клеткам, и эффекторные Т-клетки памяти двух типов: например, ТЕМ-клетки и ТЕМРА-клетки, регуляторные Т-клетки (также известные как супрессорные Т-клетки), опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), природные Т-клетки-киллеры, инвариантные Т-клетки, находящиеся в слизистой оболочке, и Т-клетки  $\gamma\delta$ . Цитотоксические Т-клетки (CTL или Т-клетки-киллеры) представляют собой субпопуляцию Т-лимфоцитов, способных индуцировать гибель инфицированных соматических или опухолевых клеток. Собственные Т-клетки пациента могут быть генетически модифицированы для нацеливания на специфические антигены путем введения CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммунореактивная клетка представляет собой Т-клетку. Т-клетка может представлять собой  $CD4^+$ -Т-клетку или  $CD8^+$ -Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Т-клетка представляет собой  $CD4^+$ -Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Т-клетка представляет собой  $CD8^+$ -Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой Т-клетку, а раскрытый здесь CAR, нацеленный на CD19, интегрирован в локус генома Т-клетки. Неограничивающие примеры локусов включают локус TRAC, локус TRBC, локус TRDC и локус TRGC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, локус представляет собой локус TRAC или локус TRBC. Способы нацеливания CAR на нужный сайт внутри генома Т-клетки раскрыты в WO 2017180989 и в публикации Eyuem et al., Nature (2017 Mar 2); 543(7643): 113-117, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой НК-клетку. Природные клетки-киллеры (NK) могут представлять собой лимфоциты, которые являются частью клеточно-опосредованного иммунитета и действуют в процессе вырабатывания врожденного иммунного ответа. Для обеспечения цитотоксического действия на клетки-мишени, НК-клеткам не требуется предварительная активация. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой генетически модифицированную НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой отредактированную НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой НК-клетку, полученную из стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой НК-клетку, полученную из плюрипотентной стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка представляет собой НК-клетку, полученную из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC).

Клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) могут быть аутологичными, неаутологичными (например, аллогенными) или полученными *in vitro* из

сконструированных клеток-предшественников или стволовых клеток.

Клетки согласно изобретению могут быть клетками миелоидного происхождения. Неограничивающие примеры клеток миелоидного происхождения включают моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, базофилы, эозинофилы, мегакарициты, тучные клетки, эритроциты, тромбоциты и стволовые клетки, из которых могут быть дифференцированы миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (например, эмбриональную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки могут быть трансдуцированы раскрытым здесь CAR, нацеленным на CD19, так, чтобы клетки экспрессировали CAR, нацеленный на CD19.

#### ***5.5. Молекулы нуклеиновой кислоты и векторы***

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим раскрытые здесь CAR, нацеленные на CD19 (например, описанные в Разделе 5.3). Настоящее изобретение также относится к клеткам, содержащим такие молекулы нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, функционально связанный с раскрытым здесь CAR, нацеленным на CD19.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор является эндогенным или экзогенным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экзогенный промотор выбран из группы, состоящей из промотора фактора элонгации (EF)-1, предраннего промотора цитомегаловируса (CMV), раннего промотора обезьяньего вируса 40 (SV40), промотора фосфоглицераткиназы (PGK), промотора металлотионеина и промотора убихитина С. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эндогенный промотор выбран из промотора TCR-альфа, промотора TCR-бета и промотора бета-2-микроглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой индуцибельный промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индуцибельный промотор выбран из группы, состоящей из промотора элемента ответа на транскрипцию (TRE) NFAT, промотора CD69, промотора CD25, промотора IL-2, промотора 4-1BB, промотора PD1 и промотора LAG3.

Раскрытый здесь предмет изобретения также относится к вектору, содержащему раскрытые в настоящей заявке молекулы нуклеиновой кислоты.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть доставлены в клетки известными способами или как описано в настоящей заявке. Генетическая модификация клетки может быть осуществлена путем трансдукции по существу однородной клеточной композиции конструкцией рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для введения конструкции ДНК в клетку используют ретровирусный вектор (например, гамма-ретровирусный вектор или лентивирусный вектор). Так, например, полинуклеотид,

кодирующий CAR, может быть клонирован в ретровирусный вектор, а экспрессия может регулироваться его эндогенным промотором, длинным концевым повтором ретровируса или промотором, специфичным для клеток-мишеней представляющего интерес типа. Могут быть также использованы и невирусные векторы.

Для первоначальной генетической модификации клетки, проводимой в целях включения описанного здесь CAR, нацеленного на CD19, для трансдукции может быть использован ретровирусный вектор, но может быть использован и любой другой подходящий вирусный вектор или невирусная система доставки. CAR может быть сконструирован в одном мультицистронном экспрессионном кластере, во множестве экспрессионных кластеров одного вектора или во множестве векторов. Примерами элементов, которые формируют полицистронный экспрессионный кластер, являются, но не ограничиваются ими, различные вирусные и невирусные внутренние сайты связывания с рибосомой (IRES, например, FGF-1 IRES, FGF-2 IRES, VEGF IRES, IGF-II IRES, IRES NF-κB, IRES RUNX1, IRES p53, IRES вируса гепатита A, IRES вируса гепатита C, IRES пестивируса, IRES афтовируса, IRES пикорнавируса, IRES полиовируса и IRES вируса энцефаломиокардита) и расщепляемые линкеры (например, пептиды 2A, например, пептиды P2A, T2A, E2A и F2A). Подходящими также являются комбинации ретровирусного вектора и соответствующей линии упаковки, в которых капсидные белки будут функциональными для инфицирования клеток человека. Известны различные клеточные линии, продуцирующие амфотропный вирус, включая, но не ограничиваясь ими, PA12 (Miller et al., (1985) *Mol Cell Biol* (1985); 5:431-437); PA317 (Miller., et al., *Mol Cell Biol* (1986); 6:2895-2902); и CRIP (Danos et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1988); 85:6460-6464). Подходящими также являются неамфотропные частицы, например, частицы, псевдотипированные оболочкой VSVG, RD114 или GALV, и любые другие частицы, известные специалистам в данной области.

Возможные методы трансдукции также включают прямое совместное культивирование клеток с клетками-продуцентами (Bregni et al., *Blood* (1992); 80:1418-1422) или культивирование только с вирусным супернатантом или с концентрированными векторными штаммами в присутствии или в отсутствии соответствующих факторов роста и поликатионов (Xu et al., *Exp Hemat* (1994); 22:223-230; и Hughes et al., *J Clin Invest* (1992); 89:1817).

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

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

Для генетической модификации клеток могут быть также применены невирусные подходы. Так, например, молекула нуклеиновой кислоты может быть введена в клетку путем введения нуклеиновой кислоты посредством липофекции (Feigner et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (1987); 84:7413; Ono et al., *Neurosci Lett* (1990); 17:259; Brigham et al., *Am J Med Sci* (1989); 298:278; Staubinger et al., *Methods in Enzymol* (1983); 101:512, Wu et al., *J Biol Chem* (1988); 263:14621; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1989); 264:16985), или микроинъекций в хирургических условиях (Wolff et al., *Science* (1990); 247:1465). Другие невирусные способы переноса генов включают трансфекцию *in vitro* с использованием фосфата кальция, DEAE-декстрана, электропорацию и слияние протопластов. Липосомы также могут быть особенно полезны для доставки ДНК в клетку. Трансплантация обычных генов в пораженные ткани индивидуума также может быть осуществлена путем переноса обычной нуклеиновой кислоты в клетки культивируемого типа *ex vivo* (например, в аутологичную или гетерологичную первичную клетку или ее потомство), после чего клетку (или ее потомство) вводят в ткань-мишень или вводят системно. Рекомбинантные рецепторы также могут быть получены или продуцированы с использованием транспозаз или целевых нуклеаз (например, нуклеаз «цинковые пальцы», мегануклеаз или TALEN, CRISPR). Временная экспрессия может быть достигнута с помощью РНК-электропорации.

Для доставки раскрытого здесь CAR, нацеленного на CD19, в клетку, могут быть также применены любые методы нацеленного редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления изобретения, систему CRISPR используют для доставки раскрытого здесь CAR, нацеленного на CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазы «цинковые пальцы» используют для доставки раскрытого здесь CAR, нацеленного на CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, систему TALEN используют для доставки раскрытого здесь CAR, нацеленного на CD19.

Система кластеризованных коротких палиндромных повторов с регулярными интервалами (CRISPR) представляет собой средство для редактирования генома, обнаруженное в прокариотических клетках. Система, используемая для редактирования генома, включает Cas9 (белок, способный модифицировать ДНК посредством cr-РНК, которая может служить в качестве направляющей РНК), РНК CRISPR (cr-РНК, которая

содержит РНК, используемую Cas9 для нацеливания его на нужный участок ДНК хозяина вместе с областью, которая связывается с tracr-РНК (обычно в форме шпильчатой петли) с образованием активного комплекса с Cas9); трансктивирующую cr-РНК (tracr-РНК, которая связывается с cr-РНК и образует активный комплекс с Cas9), и необязательный участок матрицы для репарации ДНК (ДНК, которая направляет процесс репарации клеток, позволяющий вводить специфическую последовательность ДНК). CRISPR/Cas9 часто использует плазмиду для трансфекции клеток-мишеней. cr-РНК должна быть сконструирована отдельно для каждого конкретного случая, поскольку она представляет собой последовательность, которую Cas9 использует для идентификации и прямого связывания с ДНК-мишенью в клетке. Матрица для репарации, несущая экспрессионный кластер CAR, также должна быть сконструирована отдельно для каждого конкретного случая, поскольку она должна перекрываться с последовательностями по обе стороны от сайта разрезания и кодировать последовательность вставки. Множество cr-РНК и tracr-РНК могут быть упакованы вместе с образованием одноцепочечной руководящей РНК (оцрРНК). Эта оцрРНК может быть соединена вместе с геном Cas9 и превращена в плазмиду для трансфекции в клетки.

Нуклеаза «цинковые пальцы» (ZFN) представляет собой искусственный рестриктирующий фермент, который был создан путем объединения ДНК-связывающего домена «цинковые пальцы» и домена, расщепляющего ДНК. Домен «цинковые пальцы» может быть сконструирован для нацеливания на определенные последовательности ДНК, что позволяет нуклеазе «цинковые пальцы» нацеливаться на желаемые последовательности в геномах. ДНК-связывающие домены отдельных ZFN обычно содержат множество отдельных повторов «цинковых пальцев», и каждый из них может распознавать множество пар оснований. Наиболее распространенный метод создания нового домена «цинковые пальцы» состоит в объединении меньших «модулей» цинковых пальцев с известной специфичностью. Наиболее распространенным доменом расщепления в ZFN является домен неспецифического расщепления рестриктирующей эндонуклеазой FokI типа II. В соответствии с механизмом эндогенной гомологичной рекомбинации (HR) и посредством матрицы гомологичной ДНК, несущей экспрессионный кластер CAR, ZFN могут быть использованы для встраивания экспрессионного кластера CAR в геном. Если целевая последовательность расщепляется ZFN, то механизм HR позволяет осуществлять поиск гомологии между поврежденной хромосомой и гомологичной ДНК-матрицей, а затем копировать последовательность матрицы между двумя разорванными концами хромосомы, в результате чего, гомологичная ДНК-матрица может быть интегрирована в геном.

Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), представляют собой рестриктирующие ферменты, которые могут быть сконструированы для разрезания специфических последовательностей ДНК. Система TALEN работает почти по тому же принципу, что и ZFN. Эти системы получают путем объединения эффекторного ДНК-связывающего домена, подобного активатору транскрипции, с

доменом расщепления ДНК. Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), состоят из повторяющихся мотивов из 33-34 аминокислот с двумя переменными положениями, которые точно распознаются для определенных нуклеотидов. Путем сборки массивов этих TALE, ДНК-связывающий домен TALE может быть сконструирован так, чтобы он связывался с нужной последовательностью ДНК и тем самым направлял нуклеазу к участку разрезания в специфических положениях генома. Экспрессия кДНК для ее применения в методах полинуклеотидной терапии может быть инициирована с любого подходящего промотора (например, промотора человеческого цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса 40 (SV40), металлотионеиновых промоторов или промотора убихитина С) и регулируется любым подходящим регуляторным элементом или интроном млекопитающих (например, структурой энхансер/промотор/интрон фактора элонгации 1а). Так, например, при желании, для регуляции экспрессии нуклеиновой кислоты могут быть использованы энхансеры, которые, как известно, преимущественно направляют экспрессию генов в клетках конкретных типов. Используемые энхансеры могут включать, но не ограничиваются ими, энхансеры, которые характеризуются как ткане- или клеточно-специфические энхансеры. Альтернативно, если в качестве терапевтической конструкции используется геномный клон, то регуляция может быть опосредована родственными регуляторными последовательностями или, при желании, регуляторными последовательностями, полученными из гетерологичного источника, включая любой из промоторов или регуляторных элементов, описанных выше.

Способы доставки агентов/систем редактирования генома могут варьироваться в зависимости от каждого конкретного случая. В некоторых вариантах осуществления изобретения, компоненты выбранного метода редактирования генома доставляются в виде конструкций ДНК в одной или нескольких плазмидах. В некоторых вариантах осуществления изобретения, компоненты доставляются с помощью вирусных векторов. Общие методы доставки включают, но не ограничиваются ими, электропорацию, микроинъекцию, «выстреливание» генов, импалефекцию, создание гидростатического давления, непрерывную инфузию, обработку ультразвуком, магнетофекцию, использование аденоассоциированных вирусов, псевдотипирование оболочечных белков вирусных векторов, использование цис- и транс-действующих элементов векторов, компетентных по репликации, и использование вируса простого герпеса и химических носителей (например, олигонуклеотидов, липоплексов, полимером, полиплексов, дендримеров, неорганических наночастиц и проникающих в клетку пептидов).

### ***5.6. Препараты и их введение***

Раскрытый здесь предмет изобретения также относится к композициям, содержащим раскрытые в настоящей заявке клетки, содержащие раскрытый здесь CAR, нацеленный на CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Композиции, содержащие раскрытые в настоящей заявке клетки, могут быть легко

получены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые могут быть забуферены до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно путем инъекции. С другой стороны, вязкие композиции могут быть приготовлены в пределах соответствующего диапазона вязкости, чтобы обеспечить более длительные периоды контактирования с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси.

Композиции, содержащие раскрытые в настоящей заявке клетки, могут быть введены индивидууму системно или непосредственно для индуцирования и/или усиления иммунного ответа на антиген и/или для лечения и/или профилактики новообразования. В некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытые в настоящей заявке клетки или композиции, содержащие эти клетки, вводят непосредственно в представляющий интерес орган (например, орган, пораженный новообразованием). Альтернативно, раскрытые в настоящей заявке клетки или композиции, содержащие эти клетки, вводят опосредованно в представляющий интерес орган, например, путем введения в систему кровообращения (например, в сосудистую сеть опухоли). Агенты для размножения и дифференцировки могут быть введены до, во время или после введения клеток или композиций для увеличения уровня продуцирования клеток *in vitro* или *in vivo*.

Количество вводимых клеток может варьироваться в зависимости от индивидуума, который проходит лечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидууму вводят от приблизительно  $10^4$  до приблизительно  $10^{10}$ , от приблизительно  $10^4$  до приблизительно  $10^7$ , от приблизительно  $10^5$  до приблизительно  $10^7$ , от приблизительно  $10^5$  до приблизительно  $10^9$  или от приблизительно  $10^6$  до приблизительно  $10^8$  раскрытых здесь клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидууму вводят от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $5 \times 10^8$  раскрытых здесь клеток. Более эффективные клетки можно вводить в еще меньших количествах. Обычно вводят по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^5$  клеток, и в конечном итоге, такое количество клеток составляет приблизительно  $1 \times 10^{10}$  или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидууму вводят по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , приблизительно  $5 \times 10^6$ , приблизительно  $1 \times 10^7$ , приблизительно  $2,5 \times 10^7$ , приблизительно  $5 \times 10^7$ , приблизительно  $1 \times 10^8$ , приблизительно  $1,5 \times 10^8$ , приблизительно  $2 \times 10^8$  или приблизительно  $5 \times 10^8$  раскрытых здесь клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидууму вводят приблизительно  $1 \times 10^6$  раскрытых здесь клеток. Точное определение того, что будет считаться эффективной дозой, может быть основано на факторах, индивидуальных для каждого индивидуума,

включая их телосложение, возраст, пол, массу и состояние здоровья конкретного индивидуума. Дозы могут быть легко установлены специалистами в данной области на основе приведенного здесь описания и знаний в данной области.

Описанные в настоящей заявке клетки и композиции могут быть введены любым способом, известным специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, внутривенное введение, подкожное введение, интранодальное введение, внутриопухолевое введение, интратекальное введение, внутривентральное введение, внутрикостное введение, внутрибрюшинное введение, плевральное введение и прямое введение индивидууму. Описанные в настоящей заявке клетки могут быть введены в любом физиологически приемлемом носителе, обычно внутрисосудисто, хотя они могут быть также введены в кость или в другой подходящий участок, где клетки обычно могут регенерироваться и дифференцироваться (например, в тимусе).

### **5.7. Методы лечения**

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к различным способам применения раскрытых здесь клеток или композиций, содержащих эти клетки. Описанные здесь клетки и композиции, содержащие эти клетки, могут быть использованы в терапии или в качестве лекарственного средства. Так, например, раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам индуцирования и/или усиления иммунного ответа у индивидуума, нуждающегося в этом. Описанные здесь клетки и композиции, содержащие эти клетки, могут быть использованы для уменьшения опухолевой нагрузки у индивидуума. Описанные здесь клетки и композиции, содержащие эти клетки, могут быть использованы для снижения количества опухолевых клеток, уменьшения размера опухоли и/или уничтожения опухоли у индивидуума. Описанные в настоящей заявке клетки и содержащие их композиции могут быть использованы для лечения и/или профилактики новообразования у индивидуума. Описанные в настоящей заявке клетки и содержащие их композиции могут быть использованы для увеличения продолжительности жизни индивидуума, имеющего новообразование. В некоторых вариантах осуществления изобретения, каждый из указанных выше способов включает введение раскрытых здесь клеток или композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей эти клетки, для достижения желаемого эффекта, например, для облегчения существующего состояния или профилактики рецидива. Количество, вводимое для лечения, представляет собой количество, эффективное для достижения желаемого эффекта. Эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений. Эффективное количество может быть введено в виде ударной дозы или непрерывной перфузии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование ассоциированы с CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование экспрессируют CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование сверхэкспрессируют CD19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование, которые можно лечить с использованием раскрытых здесь клеток



и композиций, представляет собой рак крови. Неограничивающими примерами рака крови являются множественная миелома, лейкоз и лимфомы. Неограничивающие примеры лейкоза включают острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), острый лимфолейкоз (ОЛЛ), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), острый лейкоз со смешанным фенотипом (ОЛСФ), ретикулоэндотелиоз и В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз. Лимфомой может быть лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лимфома представляет собой В-клеточную лимфому (ВСЛ).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование представляют собой В-клеточное злокачественное новообразование. Неограничивающие примеры В-клеточного злокачественного новообразования включают В-клеточную лимфому (ВКЛ), В-клеточный острый лимфолейкоз (ОЛЛ), В-клеточный хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), множественную миелому (ММ), ХЛЛ с трансформацией Рихтера и лимфому ЦНС. В-клеточная лимфома включает В-клеточную неходжкинскую лимфому (НХЛ) и В-клеточную лимфому Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль и/или новообразование представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления изобретения, В-клеточная лимфома представляет собой рецидивирующую или рефрактерную (Р/Р) В-клеточную лимфому.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является человек. Индивидуумы могут иметь запущенную форму заболевания, и в этом случае, целью лечения может быть смягчение или обращение вспять прогрессирования заболевания и/или ослабление побочных эффектов. Индивидуумы могут иметь в анамнезе состояние, от которого они уже проходили лечение, и в этом случае, целью терапии обычно является снижение риска или отсрочка развития рецидива.

В результате поверхностной экспрессии описанного здесь CAR, нацеленного на CD19, адоптивно перенесенные клетки обладают усиленной и селективной цитолитической активностью на участке опухоли. Кроме того, после их локализации в опухоли и их пролиферации, клетки превращают участок опухоли в высокопроводящую среду для широкого круга клеток, участвующих в физиологическом противоопухолевом ответе.

В раскрытые здесь клетки могут быть внесены дополнительные модификации для предотвращения или сведения к минимуму рисков иммунологических осложнений (известных как «злокачественная трансформация Т-клеток»), например, реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), или в том случае, когда здоровые ткани экспрессируют такие же антигены-мишени как и опухолевые клетки, что приводит к результатам, сходным с РТПХ. Возможным решением этой проблемы является встраивание гена-самоубийцы в раскрытые здесь клетки. Подходящими генами-самоубийцами являются, но не ограничиваются ими, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (hsv-tk), индуцибельный гена-самоубийца каспазы 9 (iCasp-9) и ген усеченного

полипептида рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFRt). В некоторых вариантах осуществления изобретения, ген-самоубийца представляет собой ген полипептида EGFRt. Полипептид EGFRt может способствовать элиминации Т-клеток после введения моноклонального антитела против EGFR (например, цетуксимаба). EGFRt может быть ковалентно присоединен к вышерасположенному CAR, нацеленному на CD19. Ген-самоубийца может быть включен в вектор, содержащий нуклеиновые кислоты, кодирующие описанный здесь CAR, нацеленный на CD19. Таким образом, введение пролекарства, предназначенного для активации гена-самоубийцы (например, пролекарства (например, AP1903, которое может активировать iCasp-9) во время злокачественной трансформации Т-клеток (например, РТПХ), запускает апоптоз в клетках, активированных геном-самоубийцей и экспрессирующих CAR, нацеленный на CD19. Включение гена-самоубийцы в раскрытый здесь CAR, нацеленный на CD19, обеспечивает дополнительный уровень безопасности благодаря его способности элиминировать большинство клеток, экспрессирующих рецептор, за очень короткий период времени. Клетка согласно изобретению, в которую встроен ген-самоубийца, может быть предварительно уничтожена в определенный момент времени после инфузии клеток или уничтожена при самых ранних признаках токсичности.

## 7. Примеры

Раскрытый здесь предмет изобретения будет лучше понят со ссылкой на нижеследующие примеры, которые представлены в качестве репрезентативного раскрытого здесь предмета изобретения, и которые не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

### ***Пример 1 - Идентификация и характеристика антител против CD19***

В этом примере продемонстрирована характеристика антител против CD19, содержащих  $V_H$  и  $V_L$  описанных здесь scFv. Человеческие антитела против CD19 были продуцированы из дрожжей Adimab. Антигены биотинилировали с использованием набора для биотинилирования EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (Thermo Scientific, № по каталогу 21425). Антигены концентрировали приблизительно до 1 мг/мл и буфер заменяли на PBS перед добавлением реагента для биотинилирования в молярном соотношении 1:7,5. Смесь выдерживали при 4°C в течение ночи перед очередной заменой буфера для удаления свободного биотина из раствора. Биотинилирование было подтверждено посредством связывания стрептавидинового сенсора с мечеными белками на ForteBio.

Восемь природных библиотек искусственно синтезированных дрожжей, каждая из которых содержит  $\sim 10^9$  разновидностей, размножали, как описано ранее (см., например, Y. Xu et al., PEDS 26(10), 663-70 (2013); WO2009036379; WO2010105256; и WO2012009568).

Первые два раунда отбора осуществляли методом сортирования на магнитных сферах с использованием системы Miltenyi MACS, как было описано ранее (см., например, Siegel et al., J Immunol Methods 286(1-2), 141-153 (2004)). Вкратце, дрожжевые клетки ( $\sim 10^{10}$  клеток/библиотеку) инкубировали с биотинилированным антигеном в течение 30 минут

при 30°C в промывочном буфере (забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS)/0,1% альбумине бычьей сыворотки (BSA)). После однократной промывки 40 мл охлажденного льдом промывочного буфера, клеточный осадок ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера и к дрожжам добавляли стрептавидин (500 мкл) MicroBeads, а затем инкубировали в течение 15 минут при 4°C. После этого, дрожжи осаждали, ресуспендировали в 5 мл промывочного буфера и загружали в колонку Miltenyi LS. После загрузки, 5 мл-колонку 3 раза промывали 3 мл промывочного буфера. Затем колонку удаляли из магнитного поля, дрожжи элюировали 5 мл питательной среды для культивирования, а затем культивировали в течение ночи.

Третий раунд отбора проводили с помощью проточной цитометрии (FACS). Приблизительно  $2 \times 10^7$  дрожжей осаждали, три раза промывали промывочным буфером и инкубировали при 30°C с 100-200 нМ биотинилированного антигена в равновесных условиях. Четвертый и пятый раунды отбора проводили путем инкубирования биотинилированных клеток NALM-6 и Raji с отобранными дрожжами, полученными после проведения FACS раунда 3. После инкубирования, предварительно промытые стрептавидиновые сферы M-280 Dynabeads (№ по каталогу 60210) добавляли к комплексам дрожжи/клетки млекопитающих и инкубировали. Затем комплексы разделяли с помощью магнита DynaMag-2 и удаляли несвязывающиеся супернатанты. Комплексы сфера/клетка три раза промывали 1 мл буфера для отбора. Затем захваченные комплексы переносили в колбы, содержащие среду для культивирования дрожжей в целях размножения. В шестом раунде отбора, размноженные дрожжи подвергали либо дополнительному раунду отбора клеток NALM-6/Raji, либо отбора с использованием 100 нМ рекомбинантного антигена CD19, либо негативного отбора с помощью реагента полиспецифичности (PSR) для удаления неспецифических антител.

Для истощения PSR, библиотеки инкубировали с разведением 1:10 биотинилированного реагента PSR, как было описано ранее (см., например, Y. Xu et al., PEDS 26(10), 663-70 (2013)). Затем дрожжи два раза промывали промывочным буфером и окрашивали козым  $F(ab')_2$  против человеческой каппа-цепи-FITC (LC-FITC), разведенным 1:100 (Southern Biotech, № по каталогу 2062-02), и либо стрептавидином-AF633 (SA-633), разведенным 1:500 (Life Technologies, № по каталогу S21375), либо экстравидином-фикоэртирином (EA-PE), разведенным 1:50 (Sigma-Aldrich, № по каталогу E4011), а именно, вторичными реагентами, в течение 15 минут при 4°C. После двукратной промывки промывочным буфером, охлажденным льдом, клеточный осадок ресуспендировали в 0,3 мл промывочного буфера и переносили в пробирки с фильтром для отбора. Сортинг проводили с использованием сортиера FACS ARIA (BD Biosciences) и определяли диапазон сортировки для отбора антител с желаемыми свойствами. Раунды отбора повторяли до тех пор, пока не была получена популяция со всеми желаемыми свойствами. После последнего раунда отбора, дрожжи высевали на чашки и отбирали отдельные колонии для характеристики.

#### **Диверсификация легких цепей**

Тяжелые цепи, выделенные из природного продукта, использовали для получения библиотек диверсификации легких цепей, используемых для проведения дополнительных раундов отбора. Плазмиды тяжелых цепей экстрагировали из дрожжей, размножали, а затем очищали от *E. coli* и трансформировали в библиотеку легких цепей с вариабельностью  $5 \times 10^6$ . Отбор этих библиотек проводили, как описано выше, то есть, с помощью одного раунда MACS, двух циклов отбора клеток, либо с клетками Raji, либо с клетками NALM-6, с последующим четвертым циклом отбора FACS с использованием рекомбинантного антигена CD19. Что касается диверсификации легких цепей, то отбор клеток Raji и NALM-6 включал первоначальный негативный отбор с использованием сконструированных клеток Raji и NALM-6, которые подвергались целенаправленному генетическому нокауту гена CD19. После истощения с использованием клеток с нокаутом CD19 проводили позитивный отбор с использованием сконструированных клеток Raji и NALM-6, которые сверхэкспрессировали эндогенный CD19. В различных раундах отбора FACS, библиотеки оценивали на связывание (с использованием реагента, сообщающего полиспецифичность) с PSR, на перекрестную реактивность видов и давление аффинности путем титрования антигена. Сортинг проводили в целях получения популяции с желаемыми свойствами. Отдельные колонии полсе каждого раунда отбора FACS, описанного выше, отбирали для секвенирования и характеристики.

#### **Получение и очистка антител**

Клоны дрожжей выращивали до насыщения, а затем индуцировали в течение 48 часов при 30°C со встряхиванием. После индуцирования, дрожжевые клетки осаждали и супернатанты собирали для очистки. IgG очищали с использованием колонки с белком А и элюировали уксусной кислотой, pH 2,0.

#### **Измерения величин $K_D$ на ForteBio**

Эти анти-CD19 антитела тестировали на их аффинность связывания с растворимым CD19 в системе ForteBio Octet (Octet RED384, как было описано ранее (см., например, Estep et al., Mabs 5(2), 270-278 (2013)). Вкратце, оценку аффинности ForteBio осуществляли путем загрузки IgG в режиме реального времени на датчики АНС. Антитела иммобилизовали на штифтах с антителом против человеческого IgG и связывали с растворимым слитым белком CD19-HSA (с внеклеточными доменами CD19, слитыми с человеческим сывороточным альбумином). Датчики уравнивали в выключенном состоянии в буфере для анализа в течение 30 минут, а затем отслеживали в режиме онлайн в течение 60 секунд для установления исходного уровня. Датчики с загруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ растворимого антигена слитого белка CD19-HSA в течение 3 минут, а затем на 3 минуты переносили в буфер для анализа для оценки диссоциации. Всю кинетику анализировали с использованием модели связывания 1:1. Общая информация о кинетике связывания представлена в Таблице 1. Аффинность репрезентативных антител составляла в диапазоне от 8 нМ до 20 нМ. Все антитела против CD19, представленные в Таблице 1, включают  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

Таблица 1. Кинетика связывания антител против CD19

| Антитело против CD19 | SEQ ID NO.<br>аминокислотной<br>последовательности V <sub>L</sub> | K <sub>D</sub><br>одновалентного<br>IgG (M) | K <sub>on</sub> (1/мс) | K <sub>off</sub> (1/с) |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Антитело 2           | 14                                                                | 9,01E-09                                    | 6,15E+04               | 5,54E-04               |
| Антитело 4           | 58                                                                | 9,27E-09                                    | 2,35E+04               | 2,18E-04               |
| Антитело 5           | 60                                                                | 1,04E-08                                    | 7,56E+04               | 7,85E-04               |
| Антитело 8           | 18                                                                | 8,22E-09                                    | 5,52E+04               | 4,54E-04               |
| Антитело 6           | 62                                                                | 6,40E-09                                    | 7,56E+04               | 4,84E-04               |
| Антитело 7           | 64                                                                | 1,49E-08                                    | 7,00E+04               | 1,05E-03               |
| Антитело 1           | 67                                                                | 3,29E-08                                    | 5,34E+04               | 1,76E-03               |
| Антитело 15          | 22                                                                | 2,08E-08                                    | 6,98E+04               | 1,45E-03               |

**Пример 2 - Получение CAR, нацеленных на CD19, и экспрессия CAR**

Были созданы три CAR, нацеленных на CD19, а именно, «CAR #2», «CAR #8» и «CAR #15». Экспрессию молекул CAR на клеточной поверхности оценивали с использованием конъюгированного с PE антитела против человеческого LNGFR с последующим анализом методом проточной цитометрии. LNGFR коэкспрессировался вместе с CAR посредством последовательности саморасщепляющегося линкера 2A, а поэтому экспрессию LNGFR использовали как показатель экспрессии CAR. Результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2

| CAR-T #             | LNGFR+% |
|---------------------|---------|
| CAR #2              | 53,7%   |
| CAR #8              | 64,1%   |
| CAR #15             | 18,5%   |
| Позитивный контроль | 31,6%   |
| UTD                 | 0,35%   |

UTD: нетрансдуцированные Т-клетки

Позитивный контроль представляет собой CAR, нацеленный на CD19 и содержащий мышиный scFv SJ25c1 и CD3ζ1XX, и обозначенный как «1928z1XX CAR».

**Пример 3. Активность in vitro CAR, нацеленных на CD19**

Была исследована цитотоксичность этих нацеленных на CD19 CAR в отношении CD19-экспрессирующих линий раковых клеток Raji и CD19-нокаутированных клеток Raji. Каждую линию клеток-мишеней высевали в 384-луночный планшет и добавляли CD19-CAR-T или нетрансдуцированные Т-клетки (UTD) в 4 соотношения «эффектор:мишень» (Е:Т). В качестве контроля были включены лунки только с клетками-мишенями и лунки

только с эффекторными клетками. Через 24 часа, жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа с одним раствором CellTiter-Glo® (Promega, G8462). Процент жизнеспособности клеток-мишеней вычисляли по сигналам люминесценции лунок с совместным культивированием после первого вычитания сигналов для лунок только с эффекторными клетками, а затем деления на сигналы для лунок только с клетками-мишенями. Процент уничтожения вычисляли путем вычитания процента жизнеспособности клеток-мишеней из 100%. Как показано на фигурах 1А и 1В, Т-клетки, содержащие CAR#2, Т-клетки, содержащие CAR#8, и Т-клетки, содержащие CAR#15, продемонстрировали активность против клеток Raji, в отличие от клеток Raji, нокаутированных по CD19, что указывает на то, что цитолитическая активность Т-клеток, содержащих эти CAR, нацеленные на CD19, была антиген-зависимой.

Для подтверждения антиген-зависимой цитотоксичности, Т-клетки, содержащие эти CAR, нацеленные на CD19, совместно культивировали с CD19-экспрессирующими линиями раковых клеток Raji или с клетками Raji с нокаутом CD19. Каждую линию клеток-мишеней метили фиолетовым красителем для идентификации клеток, а затем высевали в 96-луночный планшет и добавляли CD19-CAR-T или нетрансдуцированные Т-клетки (UTD) в 2 соотношения эффектор-мишень (Е:Т). В качестве контроля были включены лунки только с клетками-мишенями и лунки только с эффекторными клетками. Через 20 часов, жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания красителем для идентификации живых/погибших клеток с последующим анализом методом проточной цитометрии. Процент жизнеспособности клеток-мишеней вычисляли с помощью проточной цитометрии для живых клеток с последующим делением полученного значения на значения сигналов только для лунок с клетками-мишенями. Процент уничтожения вычисляли путем вычитания процента жизнеспособности клеток-мишеней из 100%. Как показано на фигурах 2А и 2В, Т-клетки, содержащие CAR#2, Т-клетки, содержащие CAR#8, и Т-клетки, содержащие CAR#15, продемонстрировали активность против клеток Raji, в отличие от клеток Raji, нокаутированных по CD19, что указывает на то, что цитолитическая активность Т-клеток, содержащих эти CAR, нацеленные на CD19, была антиген-зависимой.

Секрецию антиген-независимых цитокинов (IL-2 и IFN-γ) оценивали с использованием Т-клеток, содержащих CAR#2, Т-клеток, содержащих CAR#8, и Т-клеток, содержащих CAR#15, совместно культивируемых с CD19-экспрессирующими линиями раковых клеток Raji и клеток Raji, нокаутированных по CD19. Каждую линию клеток-мишеней высевали в 384-луночный планшет и добавляли CD19- CAR-T или нетрансдуцированные Т-клетки (UTD) в 4-х соотношениях эффектор:мишень (Е:Т). В качестве контроля были включены лунки только с клетками-мишенями и лунки только с эффекторными клетками. Через 24 часа, супернатант удаляли и секретируемые IFN-γ и IL2 в супернатанте детектировали с использованием набора Intellicyt QBeads Human PlexScreen (Sartorius, 90702). Результаты секреции IL-2 показаны на фигурах 3А и 3В, а результаты секреции IFN-γ показаны на фигурах 4А и 4В. Т-клетки, содержащие эти CAR,

нацеленные на CD19, продемонстрировали секрецию IL-2 и IFN- $\gamma$  при совместном культивировании с клетками Raji, в отличие от клеток Raji, нокаутированных по CD19, что указывает на антиген-зависимое высвобождение цитокинов Т-клетками, содержащими эти CAR, нацеленные на CD19.

***Пример 4 - Активность CAR, нацеленных на CD19 in vivo***

Затем исследовали активность *in vivo* Т-клеток, содержащих эти CAR, нацеленные на CD19.

Мышам NOD-scid IL2Rg<sup>null</sup> (NSG) внутривенно (iv) вводили  $0,5 \times 10^6$  клеток NALM6, экспрессирующих люцифразу светляка (клеточной линии B-ALL), либо с уровнями CD19 дикого типа (CD19-WT), либо с пониженными уровнями CD19 (CD19-Low, клон Nalm6 был получен посредством CRISPR-Cas9-редактирования гена CD19 с последующей повторной экспрессией CD19 с использованием лентивирусного вектора). Мышам с CD19 дикого типа (синий, красный) и CD19<sup>Low</sup> (зеленый) с NALM6 вводили одну внутривенную инъекцию свежих  $5 \times 10^4$  (красный) или  $2 \times 10^5$  (синий, зеленый) CAR-Т-клеток #17, #8, #15 или #2 через 4 дня. Мышей, обработанных CAR-Т-клетками, многократно визуализировали в течение 60-100 дней для оценки реакции опухоли и возможного рецидива для тщательной оценки эффективности CAR-Т-клеток. Опухолевую нагрузку анализировали с помощью биолюминесцентной визуализации до 30-го дня после инфузии Т-клеток и регистрировали для каждой мыши в указанные моменты времени как показано на фигуре 5. CAR-Т-клетки #2 продемонстрировали быструю и эффективную противоопухолевую активность, приводящую к полному удалению опухолевых клеток NALM6 WT и клеток NALM6 с низким уровнем CD19 при всех тестируемых дозах Т-клеток. Клетки #17 показали недостаточное уничтожение опухоли, что приводило к быстрому прогрессированию опухоли, и служили в качестве контроля.

***Пример 5. Связывание scFv #2 с эпитопом***

Связывание антитела против CD19 с клеточными линиями NALM6, экспрессирующими CD19, определяли с помощью серийных разведений и проточной цитометрии. Конкурентное связывание scFv с CD19-T2, SJ25c1 (из CAR 19-28z) и FMC63 (из «Tisagenlecleucel» Kymriah и «Axicabtagene ciloleucel» от Yescarta) оценивали с помощью ППП Biacore. Смесь 100 нМ CD19-HSA-His (Takeda, Cambridge) и увеличивающейся концентрации растворимого CD19-T2 SJ25c1 или FMC63 scFv (0, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 400 нМ и 800 нМ) пропускали через чип Biacore CMS с иммобилизованным scFv CD19-T2 в течение 3 минут. Диссоциацию комплексов, связанных на чипе, оценивали путем пропускания буфера HBS-EP (300 мМ NaCl) в течение 5 минут. CD19-HSA-His очищали от клеток HEK293, которые были временно трансфицированы плазмидой pcDNA3.4 (ThermoFisher), содержащей ген, экспрессирующий внеклеточный домен CD19, слитый с 10-декагистиридиновой меткой, сайтом расщепления TEV, линкером GS и HSA. Рекомбинантный CD19-HSA-His10 очищали с помощью аффинной хроматографии на никеле. Аминокислотная последовательность CD19-HSA-His10 показана на фигуре 6.

Данные по связыванию эпитопов SJ25c, FMC63 и scFv #2 представлены на Фигуре 7. Как показано на Фигуре 7, scFv #2 конкурировал с FMC63 и SJ25C1 за связывание с CD19. Эти данные показали, что scFv #2, FMC63 и scFv SJ25C1 связываются с перекрывающимся эпитопом на CD19. Неродственное антитело (анти-CTLA4 VHH), которое не связывается с CD19, не может конкурировать с scFv #2 за связывание с CD19.

### ***Пример 6 - Фармакологические исследования***

#### **Резюме**

Для подтверждения эффективности первого клинического испытания с участием человека была проведена серия исследований для того, чтобы продемонстрировать улучшенную эффективность CAR-T-клеток #2 (обозначенных в этом примере как «19(T2)28z1XX CAR») по сравнению с CAR-T-клетками 1928z (которые широко применялись в предыдущих клинических испытаниях), и такая эффективность была определена по повышенной противоопухолевой активности при низких дозах Т-клеток и повышенной стабильности ответа. CAR-T-клетки, сконструированные для экспрессии любого CAR, продемонстрировали сопоставимую цитолитическую активность, секрецию цитокинов и пролиферацию *in vitro*, но CAR-T-клетки #2 показали большую эффективность *in vivo* благодаря их большей функциональной персистенции (Feucht, et al. Nature Medicine (2019)); 25(1):82-88).

#### **Результаты**

Цитотоксическую активность CAR-T-клеток #2 и CAR-T-клеток 1928z-1XX *in vitro* оценивали с помощью 18-часового биолюминесцентного анализа. Эти два CAR были идентичны, но для разных scFv (#2 по сравнению с SJ25c1). Ретровирусный вектор, содержащий CAR #2, представлен на Фигуре 8. Рекомбинантные ретровирусные частицы были получены из упаковывающих клеток HEK293 GalV9, как было описано ранее (Przybylowski et al., (2006); 13(1):95-100). Клетки NALM6, экспрессирующие люциферазу светляка (FFL), использовали в качестве клеток-мишеней. Т-клетки выделяли путем негативного отбора из человеческих МКПК, активировали антителами против CD3/CD28, связанными с магнитными сферами, в течение 48 часов, и после удаления сфер трансдуцировали  $\gamma$ -ретровирусными векторами, экспрессирующими CAR. Популяцию CAR<sup>+</sup>-клеток определяли путем обнаружения LNGFR, который коэкспрессировался вместе с геном CAR. CAR<sup>+</sup>-Т-клетки инкубировали с клетками-мишенями NALM6 при различных соотношениях эффектора (Е) и мишени (Т) в течение 18 часов с последующим количественным определением активности FFL. Цитотоксическую активность CAR-T-клеток #2 сравнивали с активностью CAR-T-клеток 1928z-1xx, которые, как было показано ранее, эффективно уничтожают CD19<sup>+</sup>-клетки NALM6 *in vitro* (Feucht et al., Nature Medicine (2019); 25(1):82-88). Нетрансдуцированные (UT) Т-клетки использовали в качестве негативного контроля. NALM6-CD19KO представляет собой клеточную линию, полученную путем редактирования CRISPR-Cas9 гена CD19 (Hamieh et al., Nature (2019); 568(7750):112-116), и ее использовали для иллюстрации специфичности в отношении цитотоксической активности CAR-T-клеток. Был представлен репрезентативный



эксперимент ( $n=2$  независимых эксперимента для 2 здоровых доноров). Как показано на Фигуре 10, CAR-T-клетки #2 и CAR-T-клетки 1928z-1XX продемонстрировали сравнимую цитотоксичность.

Затем оценивали активность *in vivo* CAR-T-клеток #2 (представленных как «19(T2)28z1XX CAR») и CAR-T-клеток 1928z-1XX. NALM6, то есть, линию клеток опухоли человека с острым лимфобластным лейкозом пре-B, экспрессирующую нормальный (wt) или низкий уровень антигена CD19, трансдуцировали люциферазой светляка и белком, флуоресцирующим в зеленом диапазоне спектра (GFP) (Zhao et al., Cancer Cell (2015);28:415-428). Мышам, несущим NALM6 с CD19<sup>+</sup> дикого типа (синий) и с низким уровнем CD19<sup>+</sup> (красный), вводили одну внутривенную инъекцию  $2 \times 10^5$  свежих нетрансдуцированных Т-клеток, CAR-T-клеток #2 или CAR-T-клеток 1928z-1XX. Опухолевую нагрузку у каждой мыши оценивали с помощью биолюминесцентной визуализации (BLI) в течение 85 дней. В каждой группе было по пять мышей, и реакция каждой мыши показана на Фигуре 11. Как показано на Фигуре 11, CAR-T-клетки #2 и CAR-T-клетки 1928z1XX имели сходную кинетику уничтожения опухоли. кДНК CAR коэкспрессировали вместе с репортером LNGFR (для мониторинга трансдукции Т-клеток). «19(T2)28z1XX CAR» означает «#2 CAR».

Было проведено исследование и сравнение активностей CAR-T-клеток #2 и CAR-T-клеток 1928z. Сначала оценивали экспрессию CAR и фенотипы CAR-T-клеток 1928z и CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»). Вектор, содержащий 1928z CAR, показан на Фигуре 12. CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки трансдуцировали  $\gamma$ -ретровирусными векторами, которые экспрессируют CAR 1928z или CAR #2 (представленные как «19(T2)28z1XX CAR»), и получали с применением способа, подходящего для фармацевтического приготовления таких клеток. Поскольку scFv SJ25c1 в SFG-1928z происходит от мыши, а scFv #2 (обозначенный как «19(T2) scFv») является гуманизованным, то для обнаружения поверхностной экспрессии CAR использовали два различных козьих антитела, специфичных либо к области тяжелой цепи мышиного IgG (GAM), либо к области тяжелой цепи человеческой Fc-части IgG (GAN). Как показано на Фигуре 13, более 50% CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток экспрессировали CAR.

Затем фенотипы CAR-T-клеток определяли с помощью проточной цитометрии с использованием антител, которые распознают маркеры «необученных» Т-клеток, Т-клеток центральной памяти, эффекторных клеток памяти и эффекторных Т-клеток, а также маркеры истощения (LAG3, PD1 и Tim3). «SFG-T2-1XX-GAN» относится к CD4/CD8-Т-клеткам, трансдуцированным  $\gamma$ -ретровирусным вектором, экспрессирующим 19(T2)28z1XX CAR (представленный «#2 CAR»), в то время как «SFG-1928z-GAM» были получены из Т-клеток, трансдуцированных  $\gamma$ -ретровирусным вектором, экспрессирующим 1928z CAR. Как показано на Фигуре 14, фенотипы CAR-T-клеток 1928z и CAR-T-клеток #2 были сходными. Соотношение CD4/CD8-Т-клеток было сходным для CAR-T-клеток 1928z и #2, а состояния дифференцировки Т-клеток были сопоставимы между обеими CAR-группами (для CD4- и CD8-Т-клеток), как было определено по окрашиванию на

CD62L/CD45RA и CD45RA/CCR7. Экспрессия маркеров истощения PD1, LAG3 и TIM3 не выявила существенных различий между обеими группами CAR-T-клеток.

Затем оценивали и сравнивали активность *in vivo* CAR-T-клеток #2 и CAR-T-клеток 1928z. Через четыре дня, мышам в хвостовую вену вводили  $5 \times 10^5$  клеток CD19<sup>+</sup>-NALM6-FFLuc/GFP и размороженные криоконсервированные нетрансдуцированные клетки или CAR-T-клетки. Как показано на Фигуре 15, CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») обеспечивали превосходное уничтожение опухоли по сравнению с CAR-T-клетками 1928z. Выживаемость мышей, несущих CD19<sup>+</sup>-NALM6, которых обрабатывали нетрансдуцированными клетками или CAR-T-клетками, представлена на кривой Каплана-Мейера, как показано на Фигуре 16. Как показано на Фигуре 16, мыши, несущие CD19<sup>+</sup>-NALM6 и получавшие CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») выживали дольше, чем мыши, получавшие CAR-T-клетки 1928z при всех дозах CAR-T-клеток ниже  $1 \times 10^6$  клеток на мышь. Все реципиенты, получавшие CAR-T-клетки 1928z, погибали на 25-й день, в то время как в группах исследования, которые получили CAR-T-клетки #2 (обозначенные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), погибла только одна мышь. При самой высокой дозе ( $1 \times 10^6$ ) погибла одна мышь как в контрольной, так и в экспериментальной группах.

Также оценивали персистентность *in vivo* CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») и CAR-T-клеток 1928z у мышей с моделью CD19<sup>+</sup>-NALM6-лейкоза. Персистентность CAR-T-клеток через 17 дней после обработки и количество CAR-T-клеток в костном мозге (n=5 на группу) показаны на Фигуре 17. Процент экспрессии PD1, LAG3 и TIM3 CAR-T-клетками и проценты T<sub>n</sub>, T<sub>cm</sub>, T<sub>eff</sub> и T<sub>em</sub> CAR-T-клеток представлены на Фигуре 17.

Как показано на Фигуре 17, CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») были легко обнаружены в костном мозге на 17-й день, включая как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>-CAR-T-клетки. CAR-T-клеток 1928z было немного, что согласуется с их ограниченной персистентностью (Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428). Соответствующие фенотипы персистентных Т-клеток, обнаруженные на 17-й день, были в целом сходными (T<sub>n</sub>, T<sub>cm</sub> и T<sub>em</sub>), что указывало на немного более высокую долю эффекторных Т-клеток (T<sub>eff</sub>) в CAR-группе #2 (представленной как «19(T2)28z1XXCAR»). Последний фенотип указывал на более высокий уровень экспрессии PD1 и сопоставимые уровни экспрессии LAG3 и TIM3. Это наблюдение подтверждает большую персистентность CAR-T-клеток, экспрессирующих сигнальный мотив CD28/CD3z-1XX (Feucht et al., Nature Medicine (2019); 25(1):82-88).

Эти результаты подтверждают большую эффективность CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») по сравнению с CAR-T-клетками 1928z (с более высоким уровнем уничтожения опухоли при 4 дозах). Это исследование также показало, что фенотип CAR-T-клеток #2 (обозначенных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») в целом аналогичен фенотипу CAR-T-клеток 1928z и соответствует фенотипу CAR-T-клеток #2 (обозначенных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), что

обеспечивает более эффективное уничтожение опухоли благодаря их большей персистенности по сравнению с короткоживущими CAR-T-клетками 1928z.

### **Методы и материалы**

#### *Анализ на цитолитическую активность*

Анализ на основе люциферазы проводили для оценки цитотоксичности Т-клеток, трансдуцированных различными конструкциями CAR. В качестве клеток-мишеней служили клетки NALM6, экспрессирующие FFLuc-GFP. Эффекторные клетки и клетки-мишени опухоли совместно культивировали в трех экземплярах при указанном соотношении эффектор/мишень в 96-луночном планшете с черными стенками.  $5 \times 10^4$  клеток-мишеней высевали в общем объеме 100 мкл на лунку с помощью X-VIVO15 с добавлением 5% человеческой сыворотки AB (Gemini), 10 ед./мл IL7 и 10 ед./мл IL15 (PeproTech, Inc). Для определения максимальной экспрессии люциферазы (относительные световые единицы (RLU)) использовали только клетки-мишени, засеянные при той же плотности клеток. 100 мкл субстрата люциферазы (Bright-Glo; Promega) добавляли непосредственно в каждую лунку через 18 часов после совместного культивирования. Излучаемый свет определяли с помощью считывателя люминесценции на планшете. Лизис опухолевых клеток определяли по формуле  $(1 - (RLU_{sample} / (RLU_{max}))) \times 100$ .

#### *Выделение, трансдукция и размножение генетически модифицированных человеческих Т-клеток*

Лейкоцитарная пленка, взятая от неидентифицированных здоровых доноров, была приобретена в Нью-Йоркском Центре по взятию донорской крови (у специалистов, не входящих в Комиссию по исследованию). Со всеми пробами крови обращались в соответствии с необходимыми этическими нормами и процедурами безопасности. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови проводили путем центрифугирования в градиенте плотности и активировали сферами, содержащими антитела Dynabeads® ClinExVivo™ против CD3/CD28, перед трансдукцией  $\gamma$ -ретровирусным вектором путем центрифугирования на планшетах, покрытых RetroNectin (Takara), как было описано ранее (Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428). Через два дня, активированные Т-клетки удаляли и трансдуцировали путем центрифужной инокуляции, как описано ранее (Hollyman et al., J. Immunotherapy (2009); 32(2):160-180). Затем трансдуцированные клетки размножали в 6М-луночном планшете G-Rex в соответствии с инструкциями производителя (Wilson Wolf Corporation). Эффективность трансдукции определяли через 5 дней после трансдукции. При этом использовали свежие CAR-T-клетки или клетки, размороженные из криоконсервированных клеток в 50% CS10 и 5% HSA в Plasmalyte.

#### *Мыши с моделью системной опухоли*

Самцов мышей NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ null в возрасте от 6 до 12 недель использовали в соответствии с протоколом, одобренным Институциональным Комитетом по уходу за животными и по использованию животных Мемориального Онкологического Центра имени Слоана-Кеттеринга (MSKCC). При этом, были соблюдены все соответствующие

рекомендации по использованию животных и этические нормы. Обычно, мышам вводили  $0,5 \times 10^6$  опухолевых клеток NALM6 (CD19<sup>+</sup>-клеток дикого типа или клеток с низкой экспрессией), содержащих FFLuc-GFP, посредством инъекции в хвостовую вену с последующей обработкой конкретной дозой CAR-T-клеток на мышь через 4 дня после инъекции опухоли. Клетки NALM6 обеспечивали равномерную опухолевую нагрузку, и ни одна мышь не была исключена до обработки CAR-T-клетками. Методы рандомизации или «слепые» методы не применялись.

#### *Биоломинесцентная визуализация*

Опухолевую нагрузку оценивали как было описано ранее (Gade et al., Cancer Research (2005); 65(16):9080-9088). Вкратце, мышам, которые находились под анестезией 2% изофлураном в течение 10 минут, внутрибрюшинно вводили D-люциферин (ксеноген, 3 мг на мышь), ресуспендированный в PBS, и этих мышей визуализировали. Систему визуализации IVIS (PerkinElmer) использовали для визуализации биоломинесценции инъецированной опухоли. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Living Image (PerkinElmer).

#### *Антитела, используемые в проточной цитометрии*

Экспрессию поверхностных маркеров CAR-T-клеток, полученных ex vivo или выделенных из костного мозга и селезенки мыши через 17 дней после обработки  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток, определяли с использованием нижеследующих антител, конъюгированных с флуорофором: APC-Cy7-конъюгированных антител против человеческого CD8 (SK1), APC-Cy7-конъюгированных мышинных антител против человеческого CD45 (2D1), мышинового антитела BUV395 против человеческого CD4 (SK3), мышинового антитела BV421 против человеческого CD62L (DREG-56), мышинового антитела BV650 против человеческого CD45RA (HI100), мышинового антитела BV480 или BV510 против человеческого PD-1 (EH12.1) и мышинового антитела BUV737 против человеческого CD19 (SJ25C1) (BD Bioscience); PE-Cy7-конъюгированного антитела против человеческого CD8 (SK1) и PerCP-eFluor 710-конъюгированного антитела против человеческого LAG-3 (3DS223H) (eBioscience); PerCP-конъюгированного антитела против человеческого CD45RA (HI100), антитела, конъюгированного с бриллиантовым фиолетовым 785 и направленного против человеческого Tim-3 (F38-2E2) и PE-конъюгированного антитела против человеческого CD127 (IL7Ra) (Biolegend). Экспрессию 1928z CAR определяли с использованием F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента козьего антитела, конъюгированного с Alexa Fluor 647 и направленного против мышинных IgG AffiniPure. Для обнаружения CAR #2 (представленного как «19(T2)28z1XX CAR») использовали F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент козьего антитела, конъюгированного с Alexa Fluor 647 и направленного против мышинных IgG. 7-AAD (Beckman Coulter) использовали в качестве красителя для оценки жизнеспособности. Проточную цитометрию проводили на приборе Cytex Aurora (Cytex Biosciences). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo v.10.1 (FlowJo LLC).

#### *Статистические анализы*

Все статистические анализы проводили с использованием программного

обеспечения Prism 8 (GraphPad). Статистические сравнения между двумя группами определяли с помощью двустороннего непарного t-критерия. Для исследований *in vivo*, общую выживаемость представляли с помощью кривой Каплана-Мейера. Статистическую значимость определяли как  $p$ -значение  $<0,05$ .

### ***Пример 7 - Оценка токсичности***

#### **Резюме**

Токсичность CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») оценивали *in vivo* на мышах NSG, имеющих NALM6-лейкоз. Мыши, которым внутривенно вводили CAR-T-клетки 1928z в тех же дозах, служили в качестве контроля. Регистрируемые параметры включали массу всего тела, опухолевую нагрузку и выживаемость для всех мышей. Более широкие токсикологические исследования были проведены на мышах, получавших самую высокую дозу ( $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток на реципиента), то есть, дозу, которая превышает минимальную терапевтическую (лечебную) дозу у этих мышей-моделей (в 10 раз), а также превышает дозы CAR-T-клеток, используемых в медицине и пропорциональных массе тела реципиента (в 10-100 раз). Эти исследования включали: подсчет и фенотипирование Т-клеток в основном очаге опухоли (в костном мозге), оценку уровня цитокинов в сыворотке (как человеческих, то есть, Т-клеточных, так и мышинных, то есть, происходящих от хозяина), определение основных биохимических показателей сыворотки, включая ферменты печени, подсчет клеток периферической крови, определение массы органов и комплексный иммуногистохимический анализ тканей в конце исследования (дни 27-28). Инфузионные CAR-T-клетки были получены клинически значимым способом и продукты этих двух CAR-T-клеток были сопоставимыми.

Масса тела и выживаемость существенно не отличались для тестируемой и контрольной групп. Уровни сывороточных цитокинов также были сопоставимы, и ни в одной группе не наблюдалось возникновения CRS. Уровни ферментов ALT и AST были сопоставимы у обеих исследуемых групп на 10-й день. Уровни ферментов у мышей, обработанных CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX CAR»), были ниже, чем у мышей, обработанных CAR-T-клетками 1928z на 27/28-й день.

Как и ожидалось, CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») выживали дольше, чем CAR-T-клетки 1928z. У мышей в группе, получавшей CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), наблюдалось более высокое количество лимфоцитов и ретикулоцитов, чем в группе, получавшей CAR-T-клетки 1928z. У мышей, которым вводили CAR-T-клетки 1928z, наблюдались диффузные опухолевые инфильтраты, но эти инфильтраты отсутствовали у реципиентов с CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»). У мышей с персистентными CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») наблюдалась ксеногенная реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) от легкой до умеренной степени и гепатоцеллюлярный некроз.

В то время как РТПХ следует ожидать у мышей NSG, получавших высокую дозу

человеческих CAR-T-клеток, механизм последнего пока не ясен. Учитывая ксеногенный характер исследования (предрасположенность к ксенореактивности человеческих Т-клеток по отношению к тканям мыши) и его проведение с участием одного донора (с неизвестным базовым репертуаром Т-клеточных рецепторов), значимость этого нежелательного явления для аутологичной терапии у людей пока не выяснена.

#### Обоснование выбора животного-модели

Мыши NSG с моделью NALM6 широко использовались для оценки активности CD19-специфических CAR-T-клеток в лаборатории Sadelain (Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428, Feucht, et al. Nature Medicine). (2019); 25(1):82-88, Hamieh et al., Nature (2019); 568(7750):112-116, Eyquem et al., Nature (2017); 543(7643):113-117) и т.п. NALM6 представляет собой острый лимфоцитарный пре-В-клеточный лейкоз (ОЛЛ) у человека, у которого экспрессируются CD19, но не экспрессируются CD80, CD86, 4-1BBL или другие основные костимулирующие лиганды.

#### Обоснование выбора дозы и схемы лечения

Однократная внутривенная инъекция  $1 \times 10^6$  жизнеспособных CAR-T-клеток, которая была основана на % эффективности трансдукции и общем количестве жизнеспособных клеток, представляет собой выбранную дозу, учитывая, что она соответствует 10-кратной минимальной эффективной дозе ( $1 \times 10^5$  CAR-T-клеток) у этих животных-моделей (см. фигуру 15). Доза CAR-T-клеток приблизительно в 10-100 раз выше, чем апробированные дозы CD19-CAR-T-клеток для взрослых (например, апробированная доза составляет  $0,1-1,5 \times 10^8$  жизнеспособных CAR-T-клеток) при пересчете с учетом массы тела мыши и человека. Предлагаемая начальная фиксированная доза в протоколе клинических испытаний с участием человека для CAR-T-клеток #2 составляет  $25 \times 10^6$  CAR-T-клеток.

#### Методы

##### *Тестируемый образец и носитель*

Исследуемый образец представляет собой CAR-T-клетки 1928z, CAR-T-клетки #2 (представленные в этом примере как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») и нетрансдуцированные Т-клетки, полученные из Центра Клеточной Терапии и Клеточной Инженерии (CTCEF) в MSKCC. До начала исследования, клетки замораживали в жидком азоте. В день инъекции Т-клеток, клетки размораживали при 37°C и промывали 1% HSA в Plasmalyte. Затем клетки приготавливали в дозах  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  и  $1 \times 10^5$  CAR-T-клеток в объеме 200 мкл на мышь с использованием 1% HSA в Plasmalyte. Количество CAR-T-клеток определяли путем умножения общего количества клеток на процент CAR<sup>+</sup>-клеток, который был предварительно определен с помощью проточной цитометрии.

##### *Тест-система*

Эксперименты проводили с использованием самцов мышей NOD/SCID/IL-2R<sup>γ</sup>null в возрасте от 6 до 12 недель, которым вводили  $0,5 \times 10^6$  раковых клеток NALM6, содержащих FFLuc-GFP.  $1 \times 10^6$  размороженных криоконсервированных отобранных CD4/CD8-Т-клеток, трансдуцированных γ-ретровирусным вектором либо для CAR 1928z,

либо для CAR #2 (представленного как «19(T2)28z1XX CAR»), вводили мышам через четыре дня после инъекции опухолевых клеток. Ожидалось, что у необработанных мышей к 16-18 дню разовьется паралич задних конечностей из-за лейкоза, инфильтрирующего костный мозг.

Линия опухолевых человеческих клеток NALM6 дикого типа представляет собой хорошо охарактеризованную модель острого пре-B-клеточного лимфобластного лейкоза, которую специалисты лаборатории Sadelain описали в многочисленных рецензируемых публикациях (Zhao et al., Cancer Cell (2015); 28:415-428), Feucht et al., Nature Medicine (2019);25(1):82-88, Hamieh et al., Nature (2019);568(7750):112-116, Eyquem et al., Nature (2017); 543(7643):113-117).

#### *Протокол исследования*

115 мышей были разделены на группы, которым вводили CAR 1928z, CAR #2 (представленный как «19(T2)28z1XX CAR») и нетрансдуцированные группы. Всем мышам вводили  $0,5 \times 10^6$  опухолевых клеток NALM6, содержащих FFLuc-GFP, посредством инъекции в хвостовую вену за 4 дня до обработки Т-клетками. В день исследования 0, мышей распределяли по группам обработки. Каждая группа получала одну разовую дозу (200 мкл) тестируемого препарата посредством внутривенного введения. Номера, присвоенные группам, приведены в Таблице 3.

Таблица 3 - Экспериментальный протокол и номера, присвоенные группам

| Номер группы                                                                                         | Доза CAR-T ( $\times 10^6$ ) | Число мышей/группы | Пол | ID # мыши | BLI*        | Сбор крови/ткани                          | Полный анализ при вскрытии |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------|-----|-----------|-------------|-------------------------------------------|----------------------------|
| <b>Сбор крови на 10-й и 27-й (или 28-й) день и окончательное умерщвление на 27-й (или 28-й) день</b> |                              |                    |     |           |             |                                           |                            |
| 1.<br>NALM6+CAR-T-клетки 1928z                                                                       | 1,0                          | 10                 | М   | 6-15      | Изображение | Цельная кровь (день 10 и 27/28) CBC/Chem. | День 27/28                 |
| 2.<br>NALM6+CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX                                                                | 1,0                          | 10                 | М   | 66-75     | Изображение | Цельная кровь (день 10 и 27/28) CBC/Chem. | День 27/28                 |

| Промежуточное умерщвление на 17-й день       |       |    |   |                |                 |                 |     |
|----------------------------------------------|-------|----|---|----------------|-----------------|-----------------|-----|
| 3.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки 1928z           | 1,0   | 5  | М | 21-25          | Изображен<br>ие | Костный<br>мозг | Нет |
| 4.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки<br>19(T2)28z1XX | 1,0   | 5  | М | 76-80          | Изображен<br>ие | Костный<br>мозг | Нет |
| Визуализация через каждые 7 дней             |       |    |   |                |                 |                 |     |
| 5.<br>NALM6+незар-<br>аженные Т-<br>клетки   | 1,0 ‡ | 5  | М | 1-5            | Изображен<br>ие | Нет             | Нет |
| 6.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки 1928z           | 1,0   | 10 | М | 16-20<br>26-30 | Изображен<br>ие | Нет             | Нет |
| 7.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки 1928z           | 0,5   | 10 | М | 31-40          | Изображен<br>ие | Нет             | Нет |
| 8.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки 1928z           | 0,2   | 10 | М | 41-50          | Изображен<br>ие | Нет             | Нет |
| 9.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки 1928z           | 0,1   | 10 | М | 51-60          | Изображен<br>ие | Нет             | Нет |
| 10.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки<br>19(T)28z1XX | 1,0   | 10 | М | 61-65<br>81-85 | Изображен<br>ие | Нет             | Нет |
| 11.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки<br>19(T)28z1XX | 0,5   | 10 | М | 86 -95         | Изображен<br>ие | Нет             | Нет |
| 12.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки<br>19(T)28z1XX | 0,2   | 10 | М | 96-<br>105     | Изображен<br>ие | Нет             | Нет |
| 13.<br>NALM6+CAR-<br>Т-клетки                | 0,1   | 10 | М | 106-<br>115    | Изображен<br>ие | Нет             | Нет |



|             |  |  |  |  |  |  |  |
|-------------|--|--|--|--|--|--|--|
| 19(T)28z1XX |  |  |  |  |  |  |  |
|-------------|--|--|--|--|--|--|--|

\* BLI - биолюминесцентная визуализация один раз в неделю, начиная со дня 0 (инфузия CAR-T-клеток)

‡ - Нетрансдуцированные CD4/CD8-T-клетки.

‡‡ - Всех мышей взвешивали на 7-й, 11-й, 21-й и 27-й день до промежуточного или окончательного умерщвления животного.

#### Токсикологические параметры

Токсичность оценивали по изменениям массы тела после введения тестируемого препарата. Через 10 дней и 28 дней после введения тестируемого препарата, пробы крови из групп, которым вводили дозу  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток 1928z и CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), брали из орбитального венозного сплетения после анестезии 2% изофлураном. Пробы крови собирали в пробирки, содержащие сепаратор сыворотки, и использовали для оценки уровней цитокинов и ферментов печени. На 27-й и 28-й день, мышей в группах, которым вводили дозу  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток 1928z и CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), подвергали полному анализу при вскрытии в каждый указанный день.

#### Цитокиновый анализ

Сыворотку брали у мышей на 10-й и 28-й день после обработки CAR-T-клетками у групп, которым вводили CAR 1928z, CAR #2 (представленных как «19(T2)28z1XX CAR»), и которые получали дозу  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток. Пробы хранили при  $-80^\circ\text{C}$  до проведения анализа. Анализ ProcartaPlex проводили для количественного определения уровней мышинных цитокинов (MCP-1, IL-6 и G-CSF) и человеческих цитокинов (IL2, IL3, IFN-g, GM-CSF, гранзима B и TNF-a). В этом исследовании, все реагенты, относящиеся к ProcartaPlex, были приобретены у ThermoFisher Scientific. В качестве позитивного контроля использовали сыворотку, полученную от мышинной модели с тяжелым синдромом высвобождения цитокинов (Giavridis et al., Nature Medicine (2018); 24(6):731-738). 60 мкл сфер, взятых из отдельных наборов, содержащих конкретные цитокины, объединяли, и 50 мкл смесей сфер распределяли в каждую лунку 96-луночного планшета в соответствии с протоколом производителя. В лунки добавляли стандарты, контроли качества и образцы, разведенные 1:4 с использованием универсального буфера для анализа. Планшеты запечатывали, встряхивали при 500 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре и переносили в условия при  $4^\circ\text{C}$ . После инкубирования в течение ночи, планшеты встряхивали еще 30 минут при комнатной температуре со скоростью 500 об/мин. Планшеты промывали и в каждую лунку добавляли детектирующее антитело. Планшеты запечатывали и встряхивали при 500 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывки, в каждую лунку добавляли раствор стрептавидина-RPE. Планшеты запечатывали и встряхивали при 500 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре. После проведения последней стадии промывки, сферы ресуспендировали в буфере для считывания, и сигналы анализа регистрировали на приборе Luminex 200. Стандартные кривые для отдельных цитокинов были построены с использованием 5-

параметрического логарифмического уравнения, а концентрация отдельных цитокинов в каждом образце была вычислена с помощью программного обеспечения xPONENT (версии 4.2.1509.0).

### *Статистика*

Все статистические анализы проводили с использованием программного обеспечения Prism 8 (GraphPad). Статистические сравнения между двумя группами проводили с помощью двустороннего непарного t-критерия. Статистическую значимость определяли как p-значение  $<0,05$ .

### Результаты

Была проведена оценка изменения массы тела мышей во время обработки CAR-T-клетками 1928z и CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»). Мышам с опухолями NALM6 вводили  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  или  $1 \times 10^5$  CAR-T-клеток 1928z или CAR-T-клеток #2 (обозначенных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») (n=10 на группу), тогда как обработка нетрансдуцированными T-клетками служила в качестве контроля (n=5). Результаты показаны на Фигуре 18. Как показано на Фигуре 18, изменение массы тела между двумя обработками CAR-T-клетками было аналогичным.

Затем оценивали уровни ферментов печени в сыворотке мышей, обработанных CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX CAR») и CAR-T-клетками 1928z. Количественное определение уровней ферментов печени у двух мышей, получавших CAR-T-клетки на 10-й и 27/28-й день (уровень дозы= $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток, n=10 на группу), представлено на Фигуре 19. Мышей с опухолями NALM6 обрабатывали  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток 1928z или CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») и оценивали на уровни ALT и AST на 10-й и 27-й/28-й день. Как показано на Фигуре 19, уровни ферментов ALT и AST были сопоставимы в обеих исследуемых группах на 10-й день. Уровни ферментов у мышей, обработанных CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), были ниже, чем у мышей, обработанных CAR-T-клетками 1928z на 27/28-й день.

Была проведена оценка уровней человеческих и мышиных цитокинов у мышей, обработанных  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») или CAR-T-клеток 1928z на 10-й и 27-й/29-й день после инфузии. На Фигуре 20 показано количественное определение уровней человеческих цитокинов в сыворотке, взятой у двух групп мышей, получавших различные CAR-T-клетки, на 10-й и 27/28-й день (уровень дозы= $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток, n=10 на группу). Сыворотку, собранную у мышей с моделью тяжелого синдрома высвобождения цитокинов, использовали в качестве позитивного контроля (n=2) (Giavridis et al., Nature Medicine (2018); 24(6):731-738). Уровни IL2, IL3, GM-CSF, гранзима B и TNF-альфа были сопоставимы у двух групп, которым вводили CAR-T-клетки на 10-й и 27-й/28-й день. Уровень IFN- $\gamma$  в группе, получавшей CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX, был выше, чем у мышей, получавших CAR-T-клетки 1928z на 27/28-й день.

На фигуре 21 показаны результаты количественного определения уровней цитокинов у мышей, выделенных из сыворотки мышей, обработанных либо CAR-T-клетками 1928z, либо CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») (уровень дозы= $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток, n=10 на группу) на 10-й и 27-й/28-й день. Сыворотку, собранную у мышей с моделью тяжелого синдрома высвобождения цитокинов, использовали в качестве позитивного контроля (n=2) (Giavridis et al., *Nature Medicine* (2018); 24(6):731-738). На 10-й день, мыши, которым вводили CAR-T-клетки #2 (обозначенные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), имели несколько более высокие уровни MCP-1 и G-CSF, чем мыши, которым вводили CAR-T-клетки 1928z, тогда как уровень IL6 был сопоставим для обеих групп, которым вводили CAR-T-клетки. На 27/28-й день, у мышей, получавших CAR-T-клетки #2 (обозначенные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), уровни MCP-1, IL-6 и G-CSF были сходны с уровнями для группы, которой вводили CAR-T-клетки 1928z. Эти наблюдения позволяют предположить, что ни в одной из групп не было признаков синдрома высвобождения цитокинов (СВЦ).

Было определено количество клеток крови у мышей, получавших CAR-T-клетки #2 (обозначенные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») и CAR-T-клетки 1928z на 27/28 день после инфузии. Количественное определение основных клеток крови в двух разных группах обработки CAR-T-клетками на 27/28 день (уровень дозы= $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток, n=10 на группу) представлено на фигуре 22. Показано также сравнение количества нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов и ретикулоцитов. Как показано на Фигуре 22, нейтрофилы и моноциты были сопоставимы между двумя группами, которым вводили CAR-T-клетки (уровень дозы  $1 \times 10^6$ ). У мышей в группе, получавшей CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX, было более высокое количество лимфоцитов и ретикулоцитов, чем в группе, получавшей CAR-T-клетки 1928z.

Кроме того, определяли массу тела и органов мышей, обработанных CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») и CAR-T-клетками 1928z, при вскрытии. Сравнение массы тела и основных органов проводили для двух различных групп обработки CAR-T-клетками на 27/28 день (уровень дозы= $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток). Результаты показаны на Фигуре 23. Как показано на Фигуре 23, масса тела, масса селезенки и почек были сопоставимы для двух групп обработки 1 и 2. Мыши в группе, получавшей CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX (обозначенные как «SFG-19 (T2)28z-1XX»), имели меньшую массу печени, чем мыши в группе, обработанной CAR-T-клетками 1928z (помечены как «SFG-1928z»). Различия в массах сердца были приписаны несоответствующему техническому обращению.

Был проведен иммуногистохимический анализ на CD3 и CD19 в печени, в костном мозге и в селезенке мышей, обработанных CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») и CAR-T-клетками 1928z. Оценки лимфоцитов и уровней опухолевой инфильтрации в печени, в селезенке и в костном мозге у мышей через 27/28 дней после обработки CAR-T-клетками (уровень дозы= $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток, n=6) представлены на Фигуре 24. Как показано на Фигуре 24, у мышей в группе, получавшей

CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX (обозначенные как «SFG-19(T2)28z-1XX»), наблюдался более высокий уровень CD3<sup>+</sup>-клеток во всех оцениваемых органах, чем у животных, получавших CAR-T-клетки 1928z (помеченные как «SFG-1928z»). Опухолевая инфильтрация наблюдалась во всех тестируемых органах в группе, получавшей CAR-T-клетки 1928z, но не в группе, получавшей CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX.

### Выводы

Профиль токсичности CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR T-клетки 19(T2)28z1XX») сравнивали с профилем токсичности CAR-T-клеток 1928z при высокой дозе  $1 \times 10^6$  CAR-T-клеток на реципиента. При этом, никакого различия в общей массе тела или выживаемости обнаружено не было. Уровни цитокинов в сыворотке, оцененные на 10-й день, были сопоставимы между двумя группами, что позволяет предположить, что CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») с меньшей вероятностью, чем CAR-T-клетки 1928z, индуцируют синдром высвобождения цитокинов (СВЦ). Уровень печеночных ферментов был повышен в обеих группах на 10-й и 17-й день, но в меньшей степени у реципиентов, которым вводили CAR-T-клетки #2 (обозначенные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), чем у реципиентов, получавших CAR-T-клетки 1928z. Количество клеток периферической крови показало более высокое количество лимфоцитов у реципиентов, которым вводили CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), что соответствует большей персистенции последних, подтвержденной с помощью FACS-анализа (день 17) и ИГХ тканей (дни 27/28). При этом, наблюдался изолированный ретикулоцитоз без анемии, полицитемии или эритроидной гиперплазии, что, таким образом, не рассматривалось как побочный эффект.

Масса органов была одинаковой у двух групп, за исключением печени, которая была тяжелее у мышей, обработанных CAR-T-клетками 1928z, из-за значительного прогрессирования опухоли (BLI и ИHC). И напротив, у мышей, обработанных CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), ИГХ-анализ не обнаруживал наличие опухолей, что подтверждают результаты BLI у этих же мышей. Лимфоцитарные инфильтраты многих органов наблюдались у мышей-реципиентов с CAR-T-клетками #2 (представленными как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»), что соответствовало ксеногенной РТПХ. Это было подтверждено обнаружением эпителиального некроза в этих тканях. Гепатоцеллюлярный некроз легкой и средней степени тяжести также наблюдался у мышей, которым вводили CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»). Это обнаружение под микроскопом обычно не связано с РТПХ и, таким образом, представляет собой возможный побочный эффект. Его влияние на функцию печени ограничено, если учесть умеренное повышение активности печеночных ферментов (только AST, но не ALT) и нормальные значения билирубина. Другие патологические нарушения были незначительными, и одинаково представлены у двух групп обработки и, таким образом, не считались значимыми эффектами. Профили проточной цитометрии Т-клеток были сходными у двух групп

обработки, что согласуется с ожидаемым выводом о том, что CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2) 28z1XX») демонстрируют повышенную терапевтическую эффективность благодаря большей персистенции CAR-T-клеток.

Исследования токсичности с оценкой CAR-T-клеток #2 (обозначенных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») по сравнению с клинически протестированными CAR-T-клетками 1928z (Park et al., N. Engl. J. Med. (2018); 378(5):449-459), выявили наличие РТПХ от легкой до умеренной степени, а также гепатоцеллюлярный некроз от легкой до умеренной степени у мышей, получавших CAR-T-клетки #2 (обозначенные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX»).

Из данных, представленных в этом Примере и в Примере 6, можно сделать вывод, что CAR-T-клетки #2 (представленные как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») являются более активными из-за их большей персистентности по сравнению с CAR-T-клетками 1928z, но не создают каких-либо дополнительных рисков. Относительно повышенная эффективность CAR-T-клеток #2 (представленных как «CAR-T-клетки 19(T2)28z1XX») поддерживает ценность такого плана клинических испытаний с участием человека начиная с дозы  $25 \times 10^6$  CAR-T-клеток, которая является относительно низкой дозой по сравнению с дозами CAR-T-клеток, которые были использованы в большинстве испытаний по нацеливанию на CD19.

#### **Пример 8 - Фармакологические исследования**

##### *Связывание антител против CD19 на клетке*

Связывание на клетке антител против CD19, содержащих  $V_H$  и  $V_L$  scFv согласно изобретению, оценивали с помощью проточной цитометрии на эндогенных клетках Raji и клеточных линиях NALM-6, экспрессирующих CD19. Каждое антитело тестировали как на CD19-позитивных родительских линиях, так и на соответствующих CD19-нокаутированных линиях Raji и NALM-6 для подтверждения специфического связывания на клетке-мишени. Хроматограммы проточной цитометрии, показанные на фигуре 25, продемонстрировали 1-2 логарифмических сдвигов на CD19-позитивных линиях по сравнению с фоновым связыванием на соответствующих нокаутированных клеточных линиях.

Результаты проточной цитометрии с серийными разведениями, показанными на фиг. 26A-26C, продемонстрировали связывание с насыщением на клетках NALM-6. Значения EC50, вычисленные по кривым, представлены в Таблице 4. Репрезентативные антитела против CD19 связываются с CD19 на CD19-позитивных клетках NALM-6 с высокой аффинностью, составляюще по меньшей мере 0,2 нМ. Более высокая аффинность, наблюдаемая на CD19-позитивных клетках по сравнению с растворимым белком, позволяет предположить, что эти антитела связываются с эпитопом, который может быть более естественно представлен на клетках, чем в слитом белке CD19-HSA. Все антитела против CD19, показанные в Таблице 4, включают  $V_H$ , содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

Таблица 4. EC50 антител против CD19 на клетках NALM6

| Анти-CD19<br>антитело | SEQ ID NO. аминокислотной<br>последовательности V <sub>L</sub> | Аффинность связывания EC50 на<br>клетке NALM-6 (нМ) |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Антитело 2            | 14                                                             | 0,3136                                              |
| Антитело 4            | 58                                                             | 0,5195                                              |
| Антитело 5            | 60                                                             | 0,2192                                              |
| Антитело 8            | 18                                                             | 0,2097                                              |
| Антитело 6            | 62                                                             | 0,1798                                              |
| Антитело 7            | 64                                                             | 0,2104                                              |
| Антитело 1            | 67                                                             | 0,5879                                              |
| Антитело 15           | 1                                                              | 0,2698                                              |

**Пример 9. Фаза I исследования CAR-T-клеток 19(T2)28z1XX, нацеленных на CD19, у взрослых пациентов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями**

В этом примере описывается фаза I исследования CAR-T-клеток 19(T2)28z1XX, нацеленных на CD19, у взрослых пациентов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями. Термины «19(T2)28z1XX» и «19(T2)28z1XX» используются здесь как синонимы. Терапия аутологичными CAR-T-клетками, нацеленная на специфический поверхностный антиген В-клеток CD19, продемонстрировала благоприятный клинический ответ при рецидивирующих или рефрактерных (P/P) В-клеточных лимфомах (ВКЛ). Однако, несмотря на 40-60% начальный полный ответ (ПО), только у части пациентов наблюдались стойкие ремиссии, а поэтому существует необходимость дальнейшего повышения эффективности терапии с использованием CAR путем предотвращения рецидивов и достижения более глубокого клинического ответа (КО).

Протокол и методы исследования. Это исследование представляет собой одноцентровое клиническое исследование фазы I 19(T2)28z1XX, проводимое у пациентов с рецидивирующими/рефрактерными (P/P) В-клеточными злокачественными новообразованиями. Ключевыми критериями включения в группу испытаний являются наличие рецидивирующей/рефрактерной диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), высокозлокачественной BCL, первичной медиастинальной BCL, слабо выраженной BCL и хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL). Пациенты, которые ранее проходили терапию с использованием CAR, нацеленного на CD19, могут быть включены в группу испытаний при условии, что у них будет подтверждена экспрессия CD19. Ключевыми критериями исключения из исследований являются постоянная иммуносупрессия, такая как системная терапия РТПХ и наличие острого заболевания ЦНС.

В этом исследовании использовали протокол повышения дозы 3+3 для определения максимально переносимой дозы при лечении BCL. Существует 5

запланированных уровней фиксированных доз:  $25 \times 10^6$ ,  $50 \times 10^6$ ,  $100 \times 10^6$ ,  $150 \times 10^6$  и  $200 \times 10^6$  CAR-T-клеток. Пациенты получали кондиционирующую химиотерапию, проводимую в течение 3 дней с введением флударабина и циклофосфида с последующей однократной инфузией CAR-T-клеток 19(T2)28z1XX. В фазе повышения дозы могут участвовать пациенты с DLBCL, высокозлокачественной BCL и первичной медиастинальной BCL. После определения рекомендуемой дозы фазы 2 (RP2D), в исследование были включены две группы пациентов для проведения фазы испытаний с увеличением доз. Группа 1 включает пациентов с DLBCL, высокозлокачественной BCL и первичной медиастинальной BCL (то есть, в соответствии с такими же критериями включения в группу испытаний, как и в фазе повышения доз). Группа 2 включает пациентов со слабо выраженной BCL, ХЛЛ и трансформацией Рихтера. Часть исследования фазы увеличения доз была проведена для дальнейшего исследования безопасности, эффективности и фармакокинетики CAR 19(T2)28z1XX при различных показаниях. В группу испытаний было включено максимум 60 пациентов.

Основной целью исследования является оценка безопасности и переносимости и определение рекомендуемой дозы 19(T2)28z1XX для фазы 2. Ключевые вторичные цели включают оценку эффективности и фармакокинетики 19(T2)28z1XX. Исследовательские цели включают оценку В-клеточной аплазии и остаточного заболевания (MRD), характеризацию фенотипов CAR-T-клеток 19(T2)28z1XX до и после инфузии, а также анализ на сывороточные цитокины.

Хотя раскрытый здесь предмет изобретения и некоторые его преимущества были подробно описаны в настоящей заявке, однако, следует отметить, что в настоящее изобретение могут быть внесены различные изменения, замены и модификации, не выходящие за рамки существа и объема раскрытия. Кроме того, объем настоящего изобретения не ограничивается какими-либо конкретными вариантами способа, устройства, метода приготовления и состава вещества, а также способами, описанными в настоящей заявке. Из раскрытого здесь предмета изобретения, специалисту в данной области будет очевидно, что способы, устройства, методы приготовления и составы вещества или другие описанные здесь способы, которые уже существуют или будут разработаны в будущем, и которые будут выполнять по существу ту же функцию или давать по существу такой же результат, как и описанные здесь соответствующие варианты осуществления изобретения, могут входить в объем раскрытого здесь предмета изобретения. Соответственно, такие способы, устройства, методы приготовления и составы вещества или другие описанные здесь способы входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

В настоящей заявке цитируются различные патенты, патентные заявки, публикации, описания продуктов, протоколы и регистрационные номера последовательностей, которые в полном объеме и во всех целях включены в настоящее описание посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD19, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где внеклеточный антигенсвязывающий домен включает:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или ее консервативную модификацию; и/или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или ее консервативную модификацию;

ii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, или ее консервативную модификацию;

iii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, или ее консервативную модификацию;

iv) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, или ее консервативную модификацию;

v) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную



последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, или ее консервативную модификацию;

vi) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, или ее консервативную модификацию;

vii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, или ее консервативную модификацию; или

viii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или ее консервативную модификацию; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, или ее консервативную модификацию; и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66, или ее консервативную модификацию.

2. CAR по п. 1, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), Fab или F(ab)<sub>2</sub>.

3. CAR по п. 2, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv.

4. CAR по п. 3, где scFv представляет собой scFv человека.

5. CAR по любому из пп. 1-4, где варибельная область тяжелой цепи включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

6. CAR по любому из пп. 1-5, где варибельная область легкой цепи включает:

(a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13;

(b) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17;

(c) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность,







CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; а варибельная область легкой цепи включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21.

10. CAR по любому из пп. 1-9, где варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10.

11. CAR по любому из пп. 1-10, где варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

12. CAR по любому из пп. 1-11, где варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 67.

13. CAR по любому из пп. 1-12, где варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 67.

14. CAR по любому из пп. 1-13, где варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 22.

15. CAR по любому из пп. 1-14, где варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%,

приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10; и (b) варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно на 81%, приблизительно на 82%, приблизительно на 83%, приблизительно на 84%, приблизительно на 85%, приблизительно на 86%, приблизительно на 87%, приблизительно на 88%, приблизительно на 89%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99% идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 67.

16. CAR по любому из пп. 1-15, где варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; а варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 67.

17. CAR по любому из пп. 1-16, где варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; а варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 22.

18. CAR по любому из пп. 1-17, где:

(a) варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14;

(b) варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18;

(c) варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22;

(d) варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58;

(e) варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а варибельная область легкой

цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60;

(f) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62;

(g) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64;

или (h) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67.

19. CAR по любому из пп. 1-18, где:

(a) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14;

(b) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18; или

20. (c) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

21. CAR по любому из пп. 1-20, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи.

22. CAR по п. 21, где линкер состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

23. CAR по любому из пп. 1-22, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи расположены от N-конца к C-концу:  $V_L$ - $V_H$ .

24. CAR по любому из пп. 1-23, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 23.

25. CAR по любому из пп. 1-24, где трансмембранный домен содержит полипептид CD8, полипептид CD28, полипептид CD3 $\zeta$ , полипептид CD4, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид CTLA-4, полипептид PD-1, полипептид LAG-3, полипептид 2B4 или полипептид BTLA.

26. CAR по п. 25, где трансмембранный домен содержит полипептид CD28.

27. CAR по любому из пп. 1-26, где внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид CD3 $\zeta$ .

28. CAR по п. 27, где полипептид CD3 $\zeta$  представляет собой модифицированный

полипептид CD3 $\zeta$ .

29. CAR по п. 28, где модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит нативный ITAM1, вариант ITAM2, состоящий из двух мутаций с потерей функции, и вариант ITAM3, состоящий из двух мутаций с потерей функции.

30. CAR по п. 29, где нативный ITAM1 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31.

31. CAR по п. 29, где вариант ITAM2 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37.

32. CAR по п. 29, где вариант ITAM3 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41.

33. CAR по любому из пп. 28-32, где модифицированный полипептид CD3 $\zeta$  содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43.

34. CAR по любому из пп. 1-33, где внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область.

35. CAR по п. 34, где по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид DAP-10 или их комбинацию.

36. CAR по п. 35, где по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28.

37. CAR по любому из пп. 1-36, где CAR экспрессируется из вектора.

38. CAR по п. 37, где вектор представляет собой ретровирусный вектор.

39. Клетка, содержащая CAR по любому из пп. 1-38.

40. Клетка по п. 39, где клетку трансдуцируют CAR.

41. Клетка по п. 39 или п. 40, где CAR конститутивно экспрессируется на поверхности клетки.

42. Клетка по любому из пп. 39-41, где клетка представляет собой иммунореактивную клетку.

43. Клетка по любому из пп. 39-42, где клетка представляет собой клетку лимфоидного происхождения или клетку миелоидного происхождения.

44. Клетка по любому из пп. 39-43, где указанная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, природной клетки-киллера (NK), стволовой клетки, из которой могут быть дифференцированы лимфоидные клетки, и стволовой клетки, из которой могут быть дифференцированы миелоидные клетки.

45. Клетка по любому из пп. 39-44, где клетка представляет собой Т-клетку.

46. Клетка по п. 38 или п. 45, где Т-клетка выбрана из группы, состоящей из хелперных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток, Т-клеток памяти, регуляторных Т-клеток, опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), природных Т-клеток-киллеров, инвариантных Т-клеток слизистой оболочки и  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

47. Клетка по любому из пп. 39-44, где клетка представляет собой NK-клетку.



48. Клетка по п. 47, где НК-клетка получена из стволовой клетки.
49. Клетка по п. 44 или 48, где стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.
50. Клетка по п. 49, где плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбриондную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку.
51. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по любому из пп. 1-38.
52. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 51, дополнительно содержащая промотор, который функционально связан с CAR.
53. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 52, где промотор является эндогенным или экзогенным.
54. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 53, где экзогенный промотор выбран из группы, состоящей из промотора фактора элонгации (EF)-1, предраннего промотора цитомегаловируса (CMV), раннего промотора обезьяньего вируса 40 (SV40), промотора фосфоглицераткиназы (PGK), промотора металлотионеина и промотора убихитина С.
55. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 51, где промотор представляет собой индуцибельный промотор.
56. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 55, где индуцибельный промотор выбран из группы, состоящей из промотора элемента ответа на транскрипцию (TRE) NFAT, промотора CD69, промотора CD25, промотора IL-2, промотора 4-1BB, промотора PD1 и промотора LAG3.
57. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 53, где промотор представляет собой эндогенный промотор.
58. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 57, где эндогенный промотор выбран из альфа-промотора TCR, бета-промотора TCR и бета-2-микроглобулинового промотора.
59. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51-58.
60. Вектор по п. 59, где вектор представляет собой ретровирусный вектор.
61. Клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 51-58.
62. Клетка по п. 61, где клетка представляет собой Т-клетку или природную клетку-киллер (NK).
63. Композиция, содержащая клетку по любому из пп. 39-50, 61 и 62.
64. Композиция по п. 63, которая представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.
65. Композиция по п. 63 или п. 64, содержащая от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $5 \times 10^8$  клеток.
66. Композиция по п. 63 или п. 64, содержащая от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $1 \times 10^8$  клеток.
67. Композиция по п. 63 или п. 64, содержащая от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $5 \times 10^7$  клеток.

68. Композиция по любому из пп. 63-67, содержащая приблизительно  $2,5 \times 10^7$  клеток.

69. Способ уменьшения опухолевой нагрузки у индивидуума, включающий введение индивидууму клетки по любому из пп. 39-50, 61 и 62 или композиции по любому из пп. 63-68.

70. Способ по п. 69, где указанный способ уменьшает количество опухолевых клеток, уменьшает размер опухоли и/или уничтожает опухоль у индивидуума.

71. Способ увеличения или повышения продолжительности жизни индивидуума с новообразованием, включающий введение индивидууму клетки по любому из пп. 39-50, 61 и 62 или композиции по любому из пп. 63-68.

72. Способ лечения и/или профилактики новообразования у индивидуума, включающий введение индивидууму клетки по любому из пп. 39-50, 61 и 62 или композиции по любому из пп. 63-68.

73. Способ по любому из пп. 69-72, где опухоль и/или новообразование связаны с CD19.

74. Способ по любому из пп. 69-73, где опухоль и/или новообразование представляет собой рак крови.

75. Способ по п. 74, где рак крови выбран из группы, состоящей из множественной миеломы, лейкоза и лимфом.

76. Способ по п. 75, где лейкоз выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), острого лимфолейкоза (ОЛЛ), хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ), острого лейкоза смешанного фенотипа (ОЛСФ), ретикулоэндотелиоза и В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза.

77. Способ по п. 75, где лимфома представляет собой лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому.

78. Способ по любому из пп. 69-73, где опухоль и/или новообразование представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

79. Способ по п. 78, где В-клеточное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из В-клеточных неходжкинских лимфом (НХЛ), В-клеточных лимфом Ходжкина, В-клеточного острого лимфолейкоза (ОЛЛ), В-клеточного хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), множественной миеломы (ММ), ХЛЛ с трансформацией Рихтера и лимфомы ЦНС.

80. Способ по любому из пп. 69-79, где опухоль и/или новообразование представляет собой В-клеточную лимфому.

81. Способ по п. 80, где В-клеточная лимфома представляет собой рецидивирующую или рефрактерную (R/R) В-клеточную лимфому.

82. Способ по любому из пп. 69-81, где индивидуумом является человек.

83. Клетка по любому из пп. 39-50, 61 и 62 или композиция по любому из пп. 63-68 для применения в терапии.

84. Клетка по любому из пп. 39-50, 61 и 62 или композиция по любому из пп. 63-68 для применения в лечении и/или профилактике новообразования у индивидуума.

85. Клетка по любому из пп. 39-50, 61 и 62 или композиция по любому из пп. 63-68 для применения в увеличении или повышении продолжительности жизни индивидуума с новообразованием.

86. Клетка по любому из пп. 39-50, 61 и 62 или композиция по любому из пп. 63-68 для применения в лечении и/или профилактике новообразования у индивидуума.

87. Клетка или композиция для применения по любому из пп. 84-86, где опухоль и/или новообразование ассоциированы с CD19.

88. Клетка или композиция для применения по любому из пп. 84-87, где опухоль и/или новообразование представляет собой рак крови.

89. Клетка или композиция для применения по п. 88, где рак крови выбран из группы, состоящей из множественной миеломы, лейкоза и лимфом.

90. Клетка или композиция для применения по п. 89, где лейкоз выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), острого лимфолейкоза (ОЛЛ), хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ), острого лейкоза со смешанным фенотипом (ОЛСФ), ретикулоэндотелиоза и В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза.

91. Клетка или композиция для применения по п. 89, где лимфома представляет собой лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому.

92. Клетка или композиция для применения по любому из пп. 84-87, где опухоль и/или новообразование представляют собой В-клеточное злокачественное новообразование.

93. Клетка или композиция для применения по п. 92, где В-клеточное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из В-клеточных неходжкинских лимфом (НХЛ), В-клеточных лимфом Ходжкина, В-клеточного острого лимфолейкоза (ОЛЛ), В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), множественной миеломы (ММ), ХЛЛ с трансформацией Рихтера и лимфомы ЦНС.

94. Клетка или композиция для применения по любому из пп. 84-93, где опухоль и/или новообразование представляют собой В-клеточную лимфому.

95. Клетка или композиция для применения по п. 94, где В-клеточная лимфома представляет собой рецидивирующую или рефрактерную (R/R) В-клеточную лимфому.

96. Клетка или композиция для применения по любому из пп. 84-95, где индивидуумом является человек.

97. Способ получения клетки, содержащей CAR по любому из пп. 1-38, включающий введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR по любому из пп. 1-38.

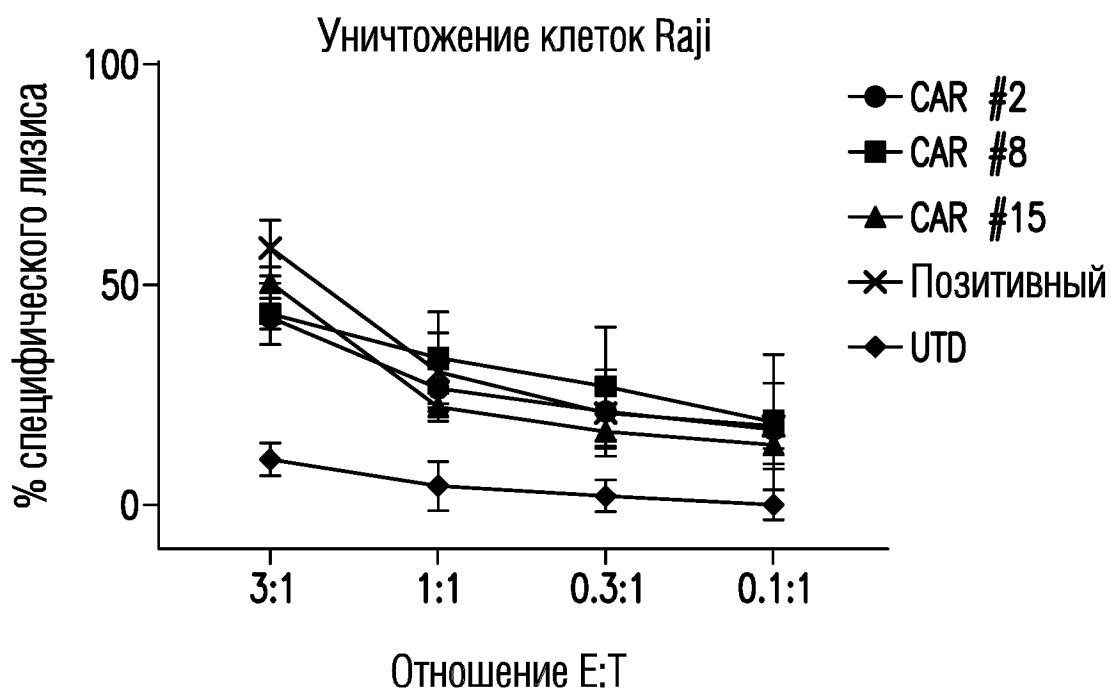
98. Набор для уменьшения опухолевой нагрузки у индивидуума, лечения и/или профилактики новообразования у индивидуума и/или увеличения или повышения продолжительности жизни индивидуума с новообразованием, где указанный набор

содержит клетку по любому из пп. 39-50, 61 и 62.

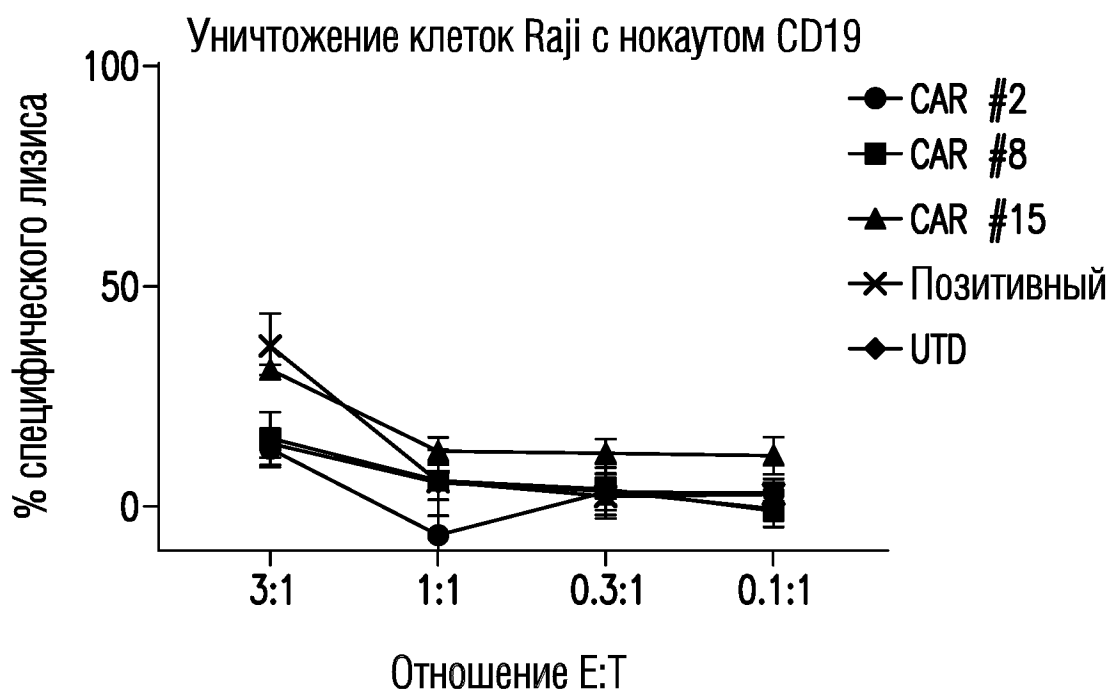
99. Набор по п. 98, где указанный набор дополнительно содержит письменные инструкции по применению клетки для снижения опухолевой нагрузки у индивидуума, лечения и/или профилактики новообразования у индивидуума и/или увеличения или повышения продолжительности жизни индивидуума, имеющего новообразование.

По доверенности

1/28



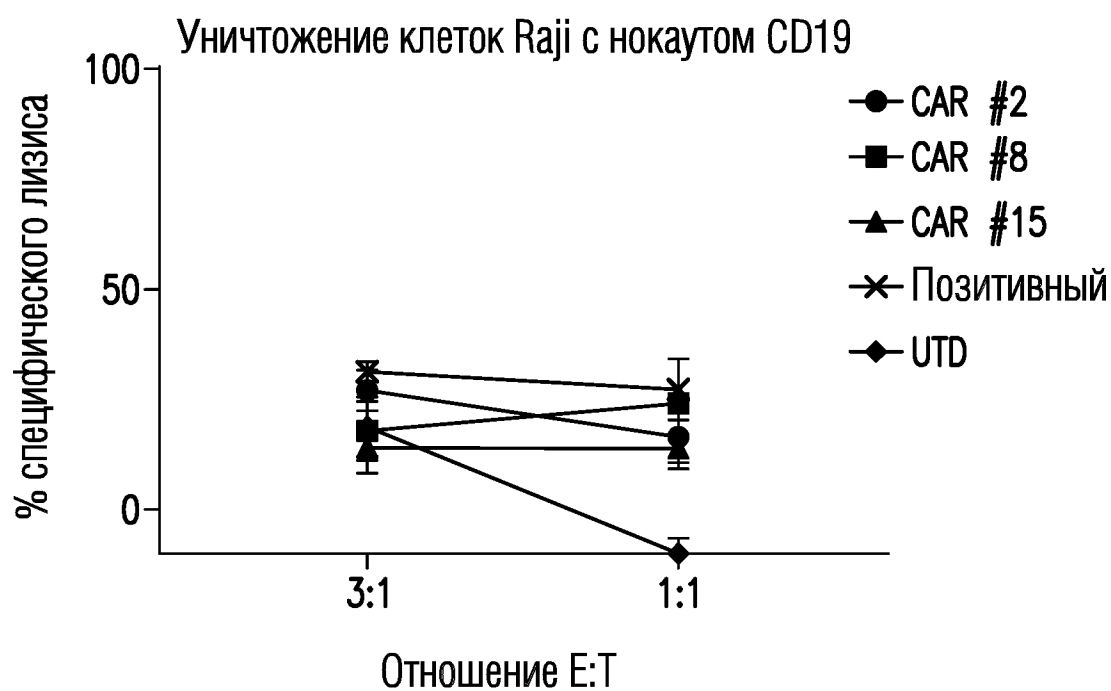
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В



ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

3/28

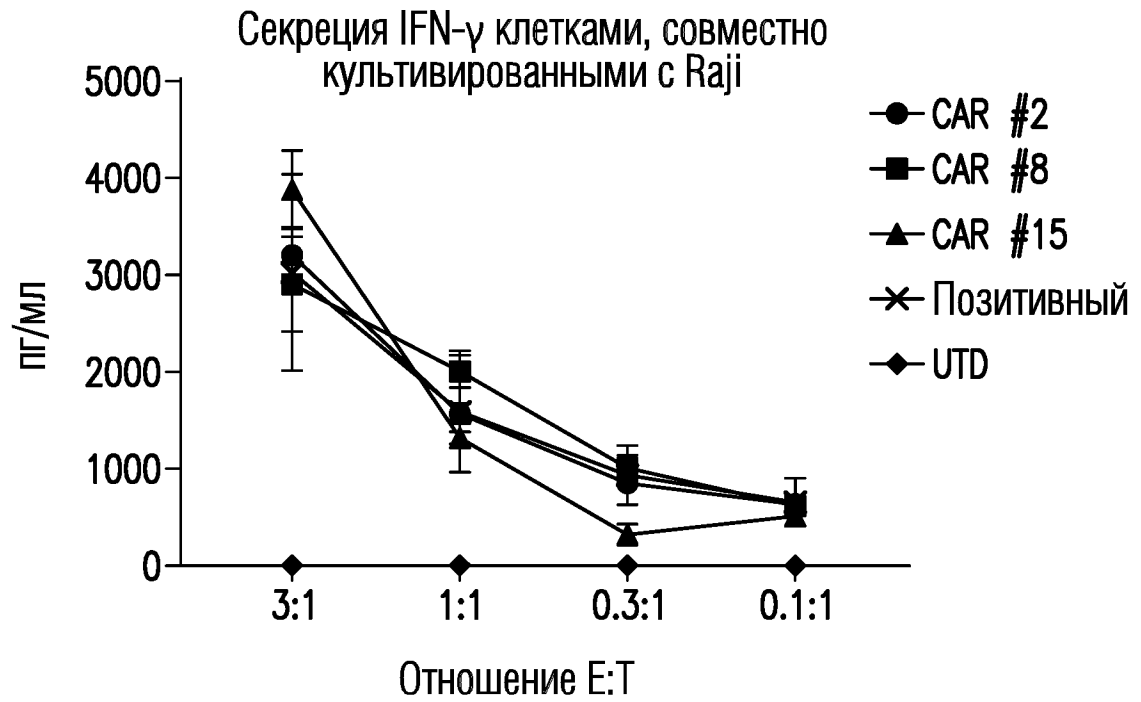


ФИГ. 3А

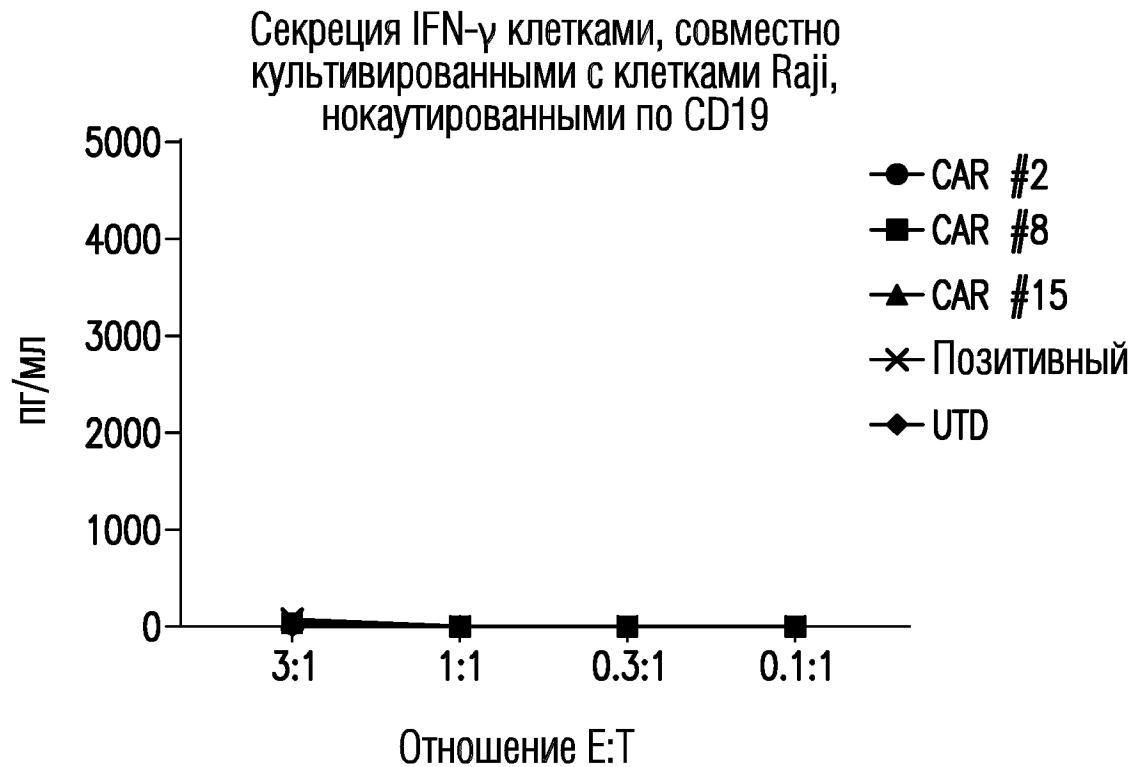


ФИГ. 3В

4/28

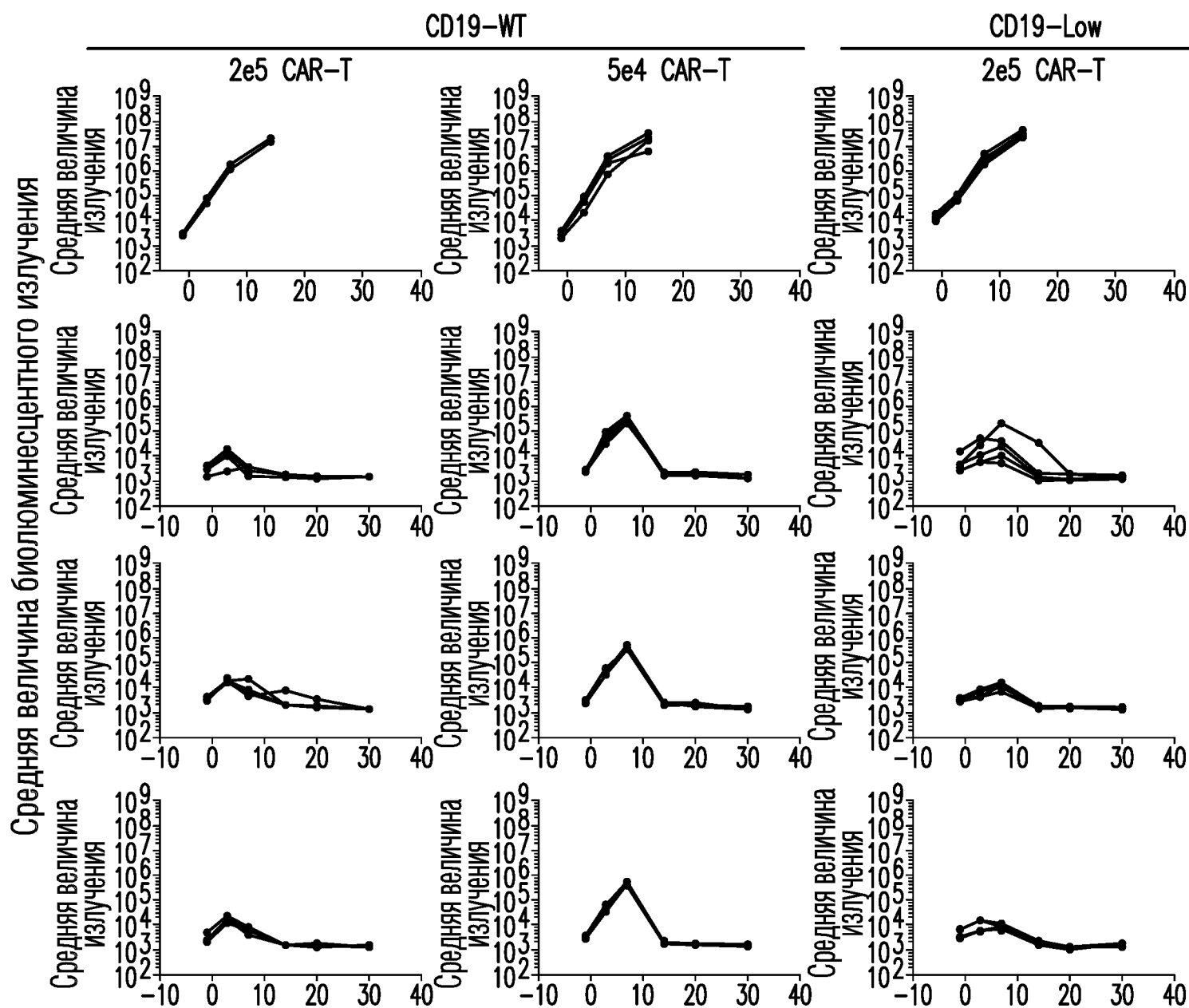


ФИГ. 4А



ФИГ. 4В





Неэффективные CAR-T-клетки  
#17

#8

#15

#2

ФИГ. 5

Последовательность белка:

CD19ss: Выделено **красным**

His: Выделено **синим**

HSA: Выделено **пурпурным**

Tev Site: Выделено **зеленым**

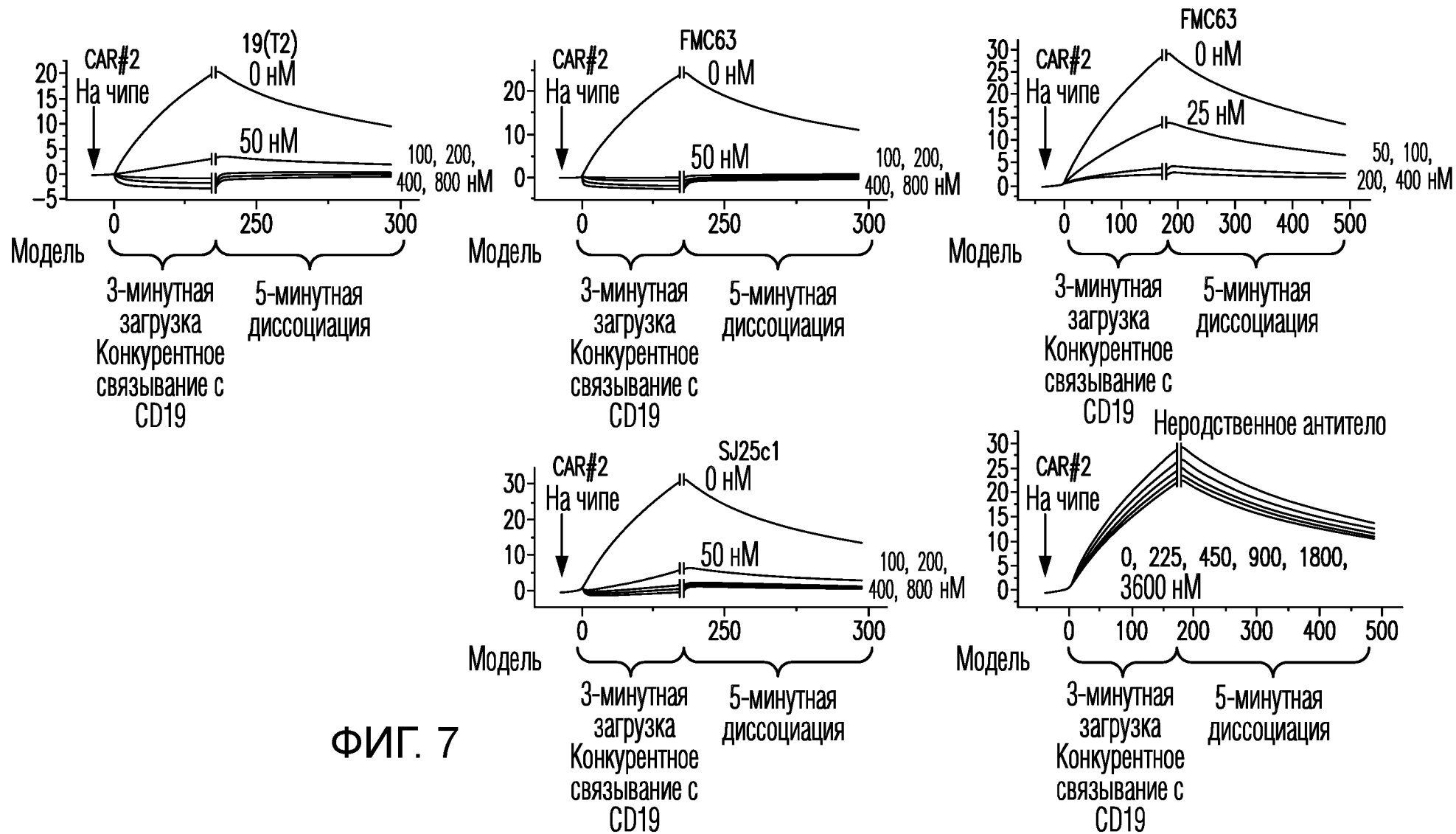
>CD19\_ECD\_C10HisTev-GS\_HSA\_mat

SEQ ID

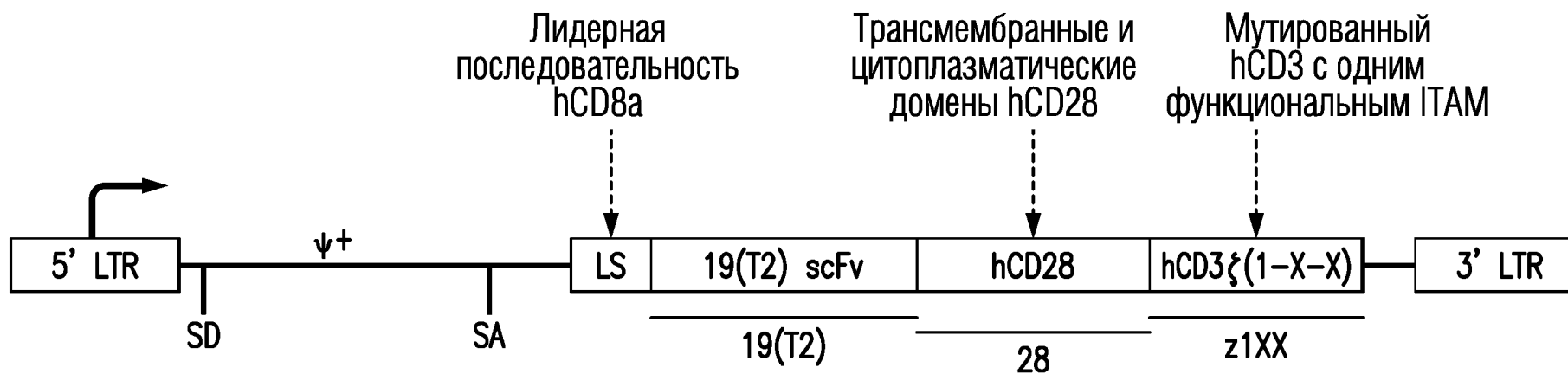
NO: 77 **MPPPRLLFFLLFLTPMEVR**PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLC  
QPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLT  
MAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP KSLLSLELKDDRPARDMWMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRG NLTMSFHLEITARPVLWH  
WLLRTGGWK **HHHHHHHHHH**HDYDIPTT **ENLYEQ**GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDH  
**VKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKS LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETF**  
**LKKYLYEIARRHPYFYAPELLFAKRYKA AFTGCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAE**  
**VSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVL**  
**GMFLYEYARRHPDYSV LLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV**  
**EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSV LNLQCLVLEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE**  
**RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL**

6/28

ФИГ. 6



ФИГ. 7



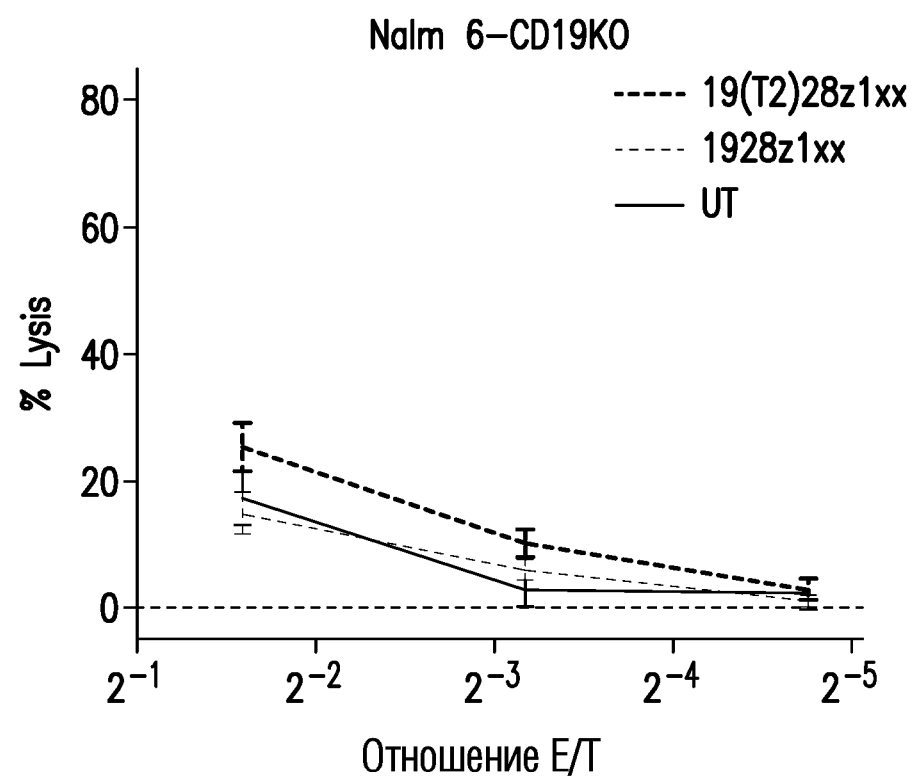
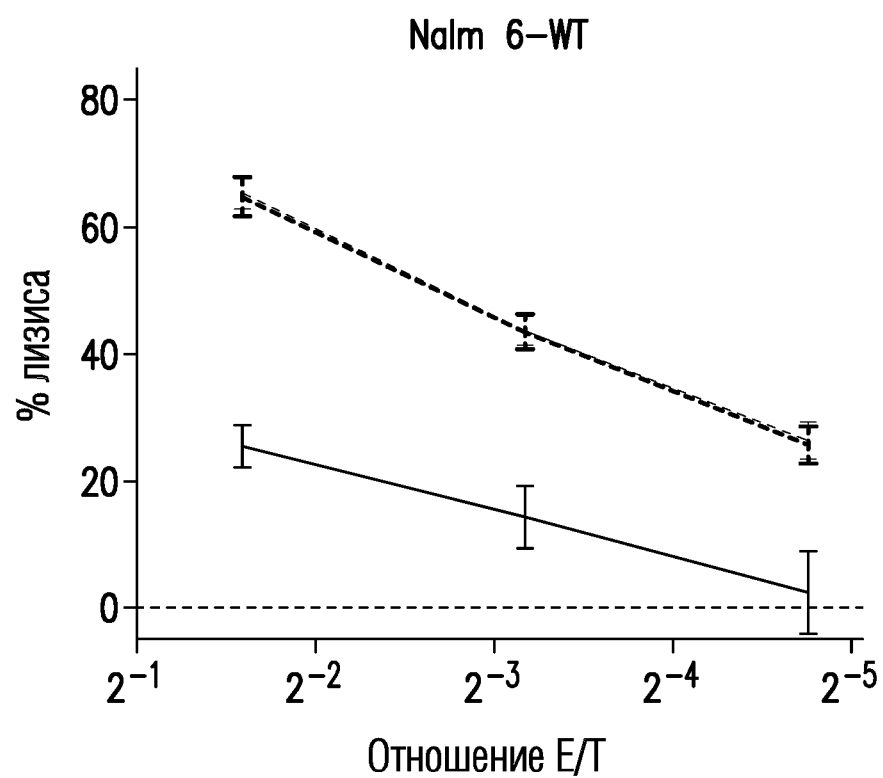
ФИГ. 8

Последовательность белка

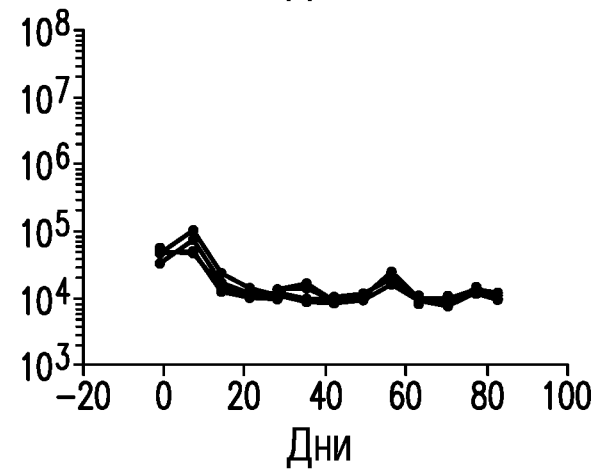
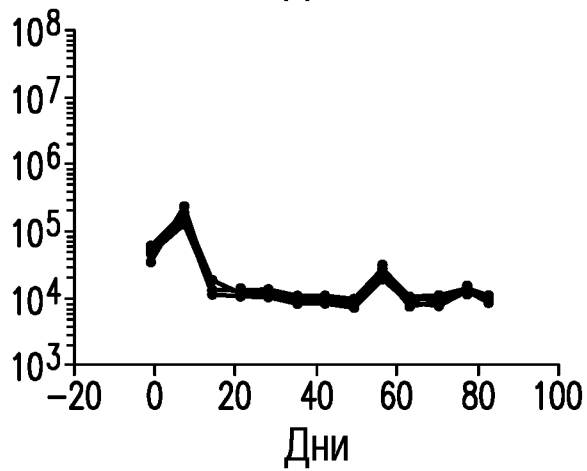
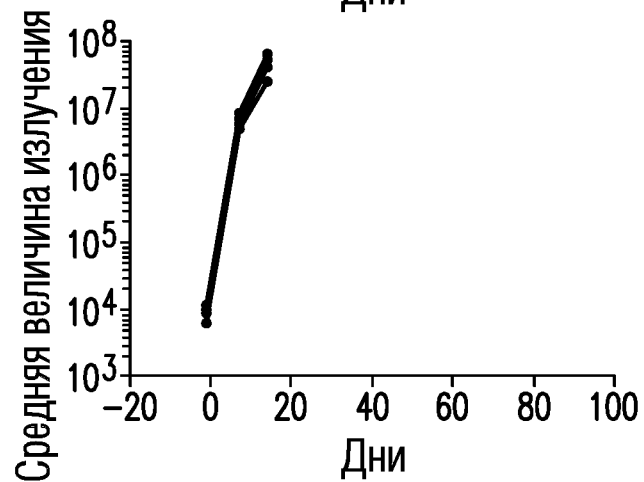
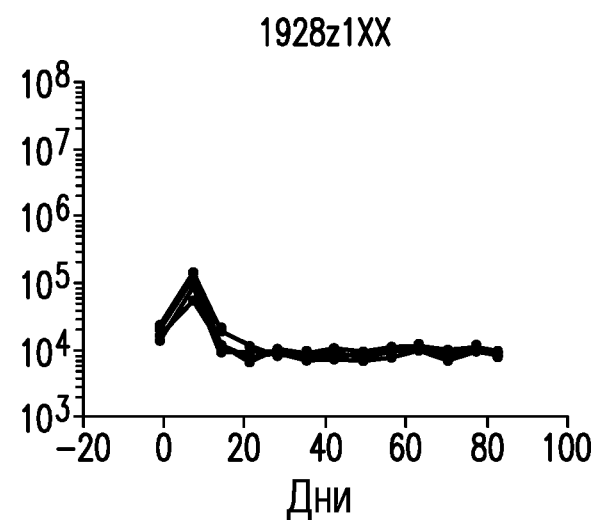
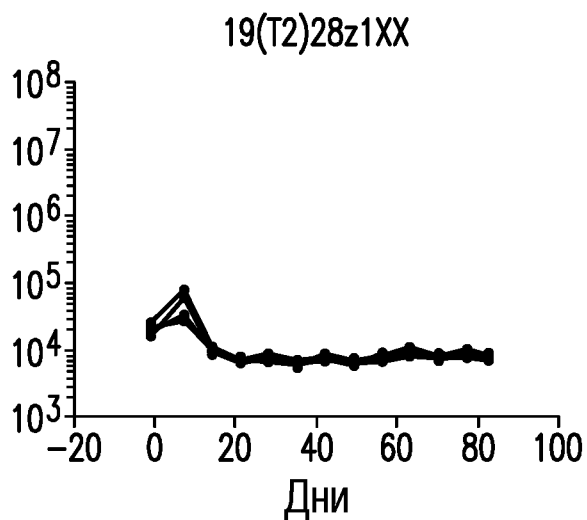
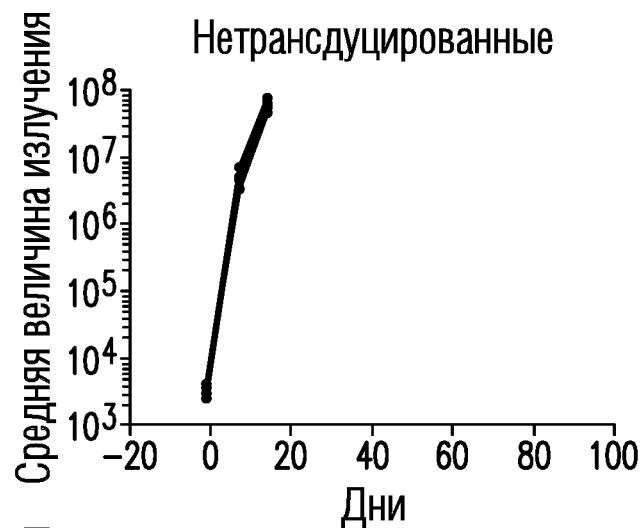
Сходство : 108/112 (96.42%)

|               |         |    |                                                                        |     |
|---------------|---------|----|------------------------------------------------------------------------|-----|
| SEQ ID NO: 43 | CD3z1xx | 1  | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL <u>FN</u>   | 60  |
|               |         |    | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL+N           |     |
| SEQ ID NO: 30 | CD3z    | 1  | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL <u>YN</u>   | 60  |
|               | CD3z1xx | 61 | ELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGL <u>F</u> QGLSTATKDT <u>F</u> DALHMQALPPR | 112 |
|               |         |    | ELQKDKMAEA+SEIGMKGERRRGKGHDGL+QGLSTATKDT+DALHMQALPPR                   |     |
|               | CD3z    | 61 | ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL <u>Y</u> QGLSTATKDT <u>Y</u> DALHMQALPPR | 112 |

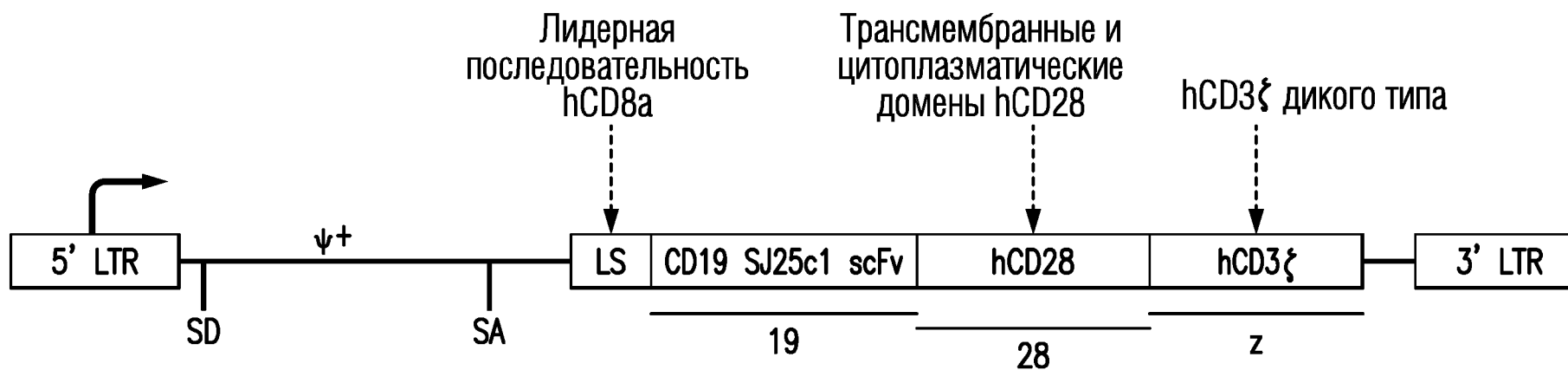
ФИГ. 9



ФИГ. 10

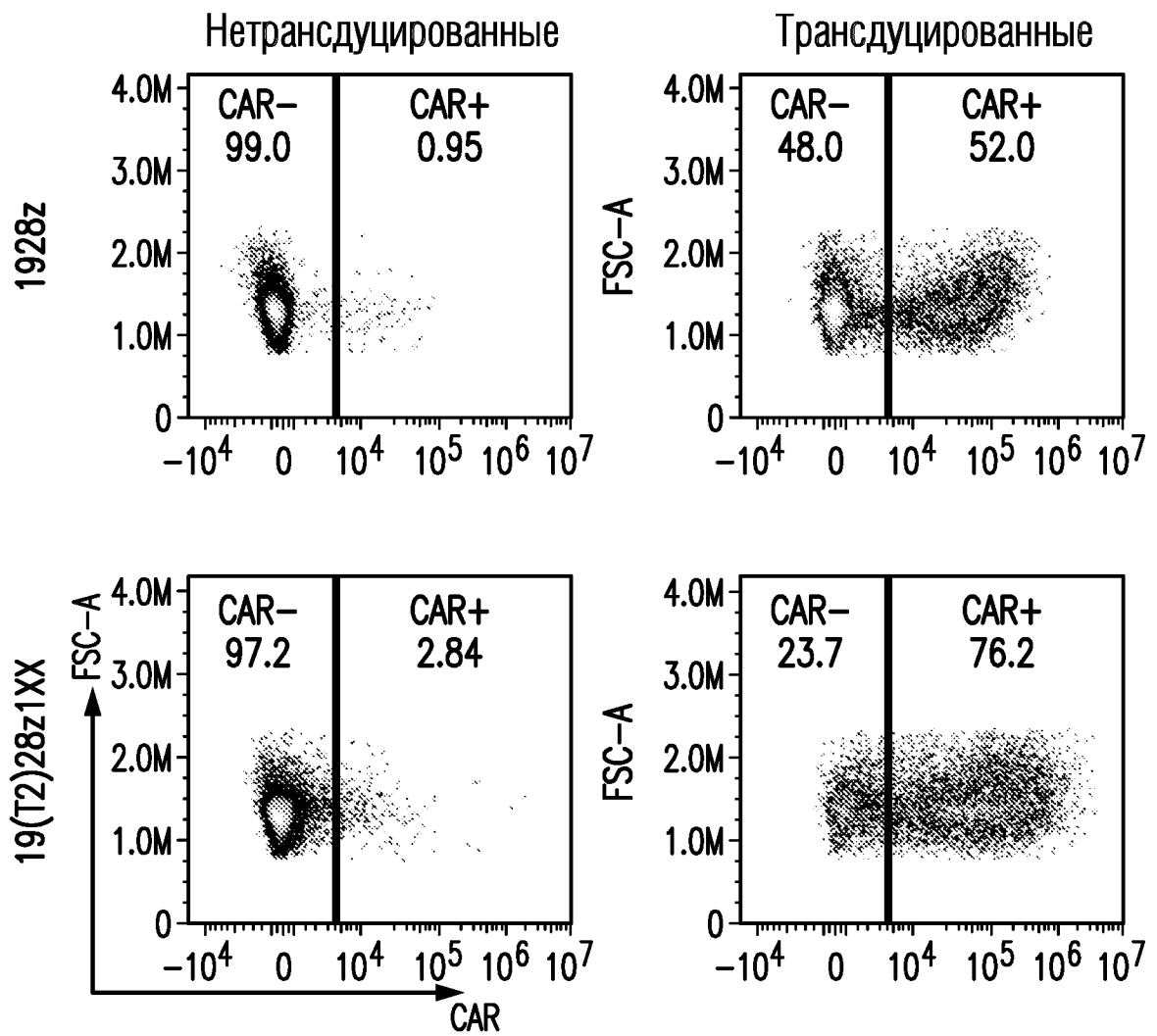


ФИГ. 11

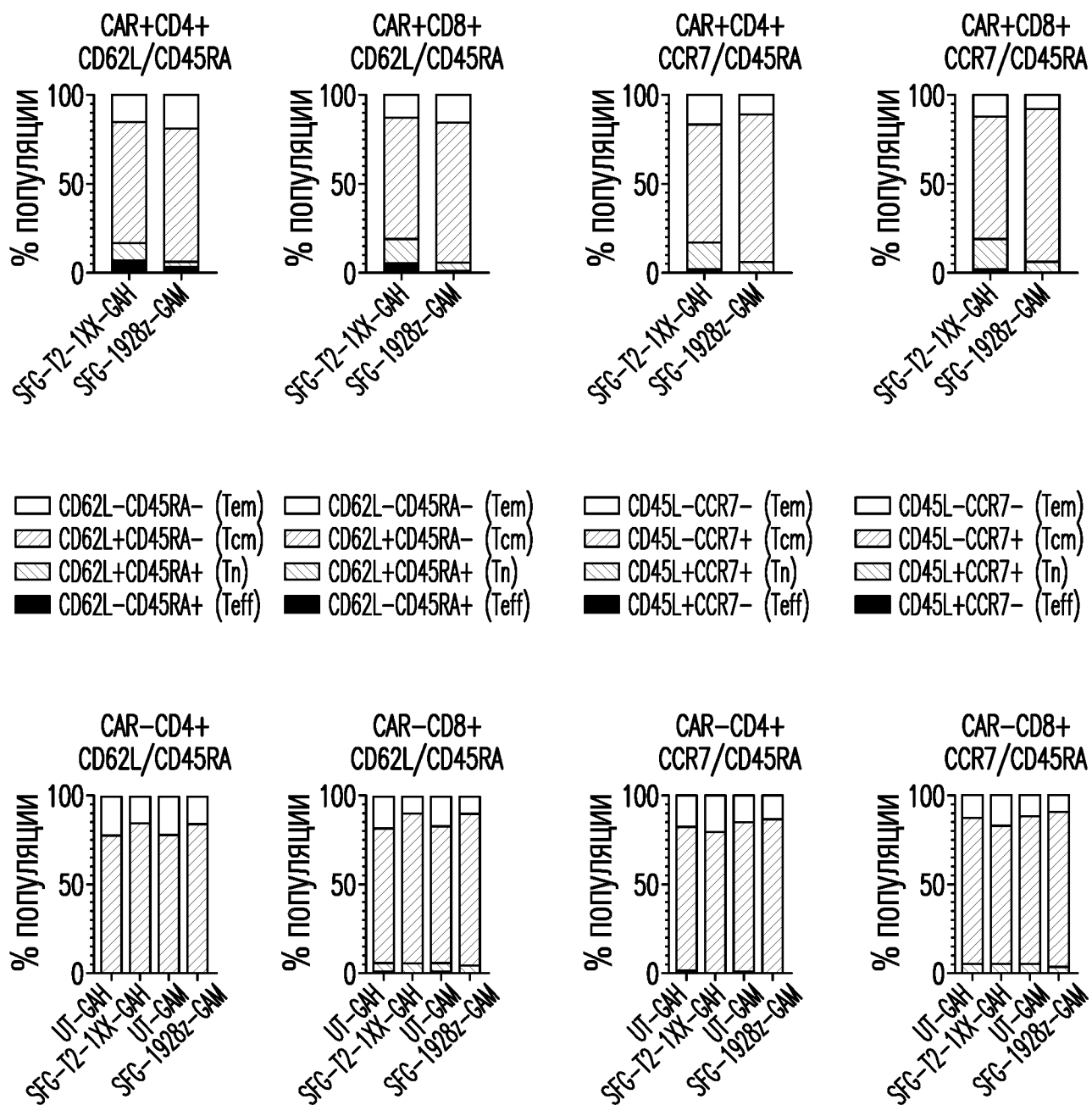


ФИГ. 12

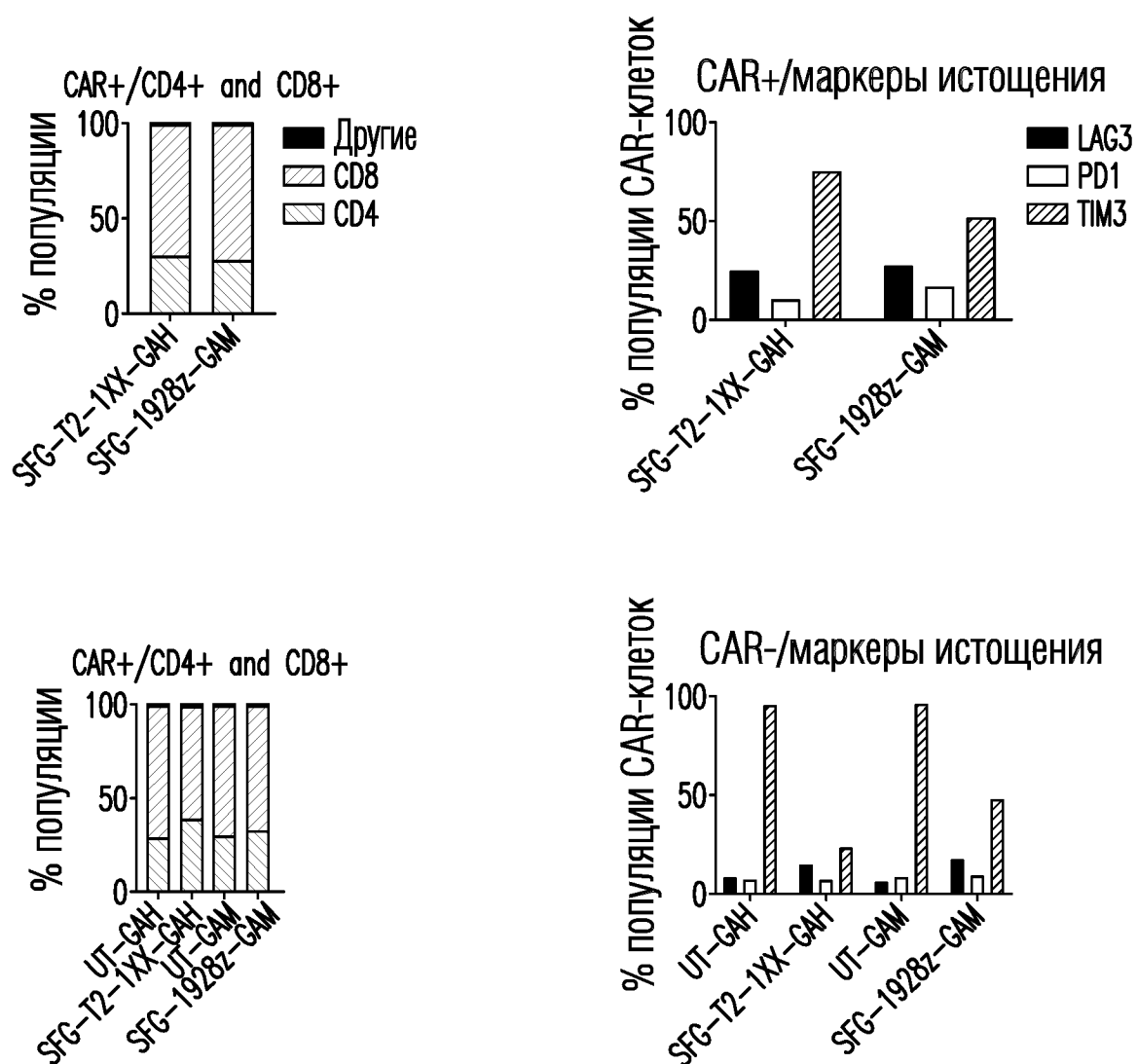




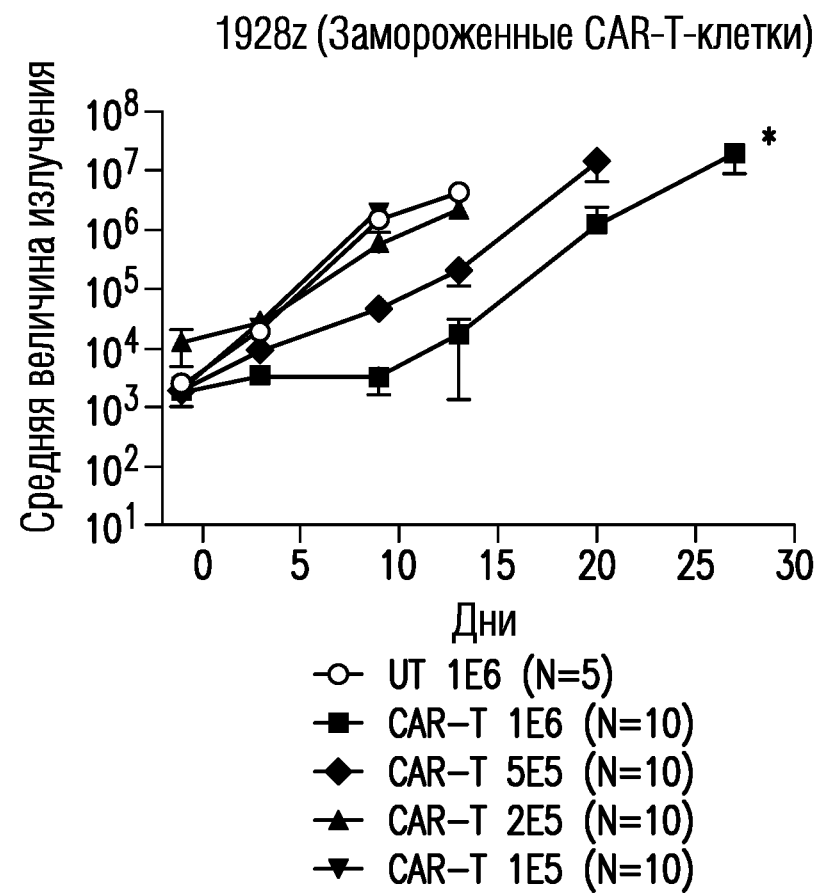
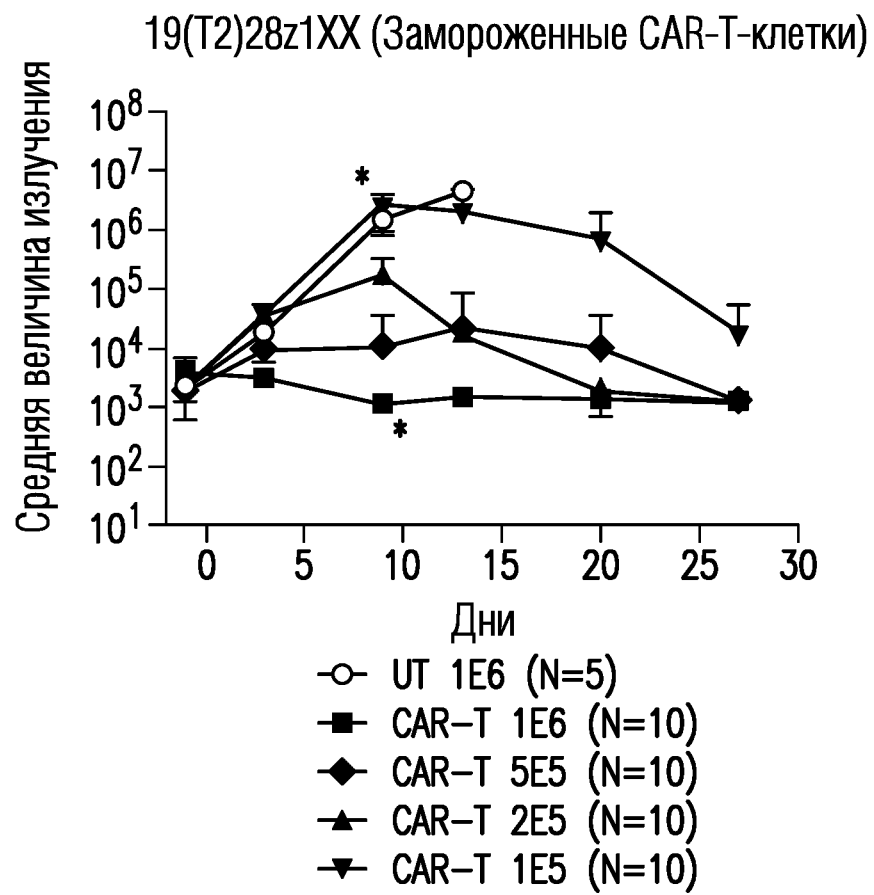
ФИГ. 13



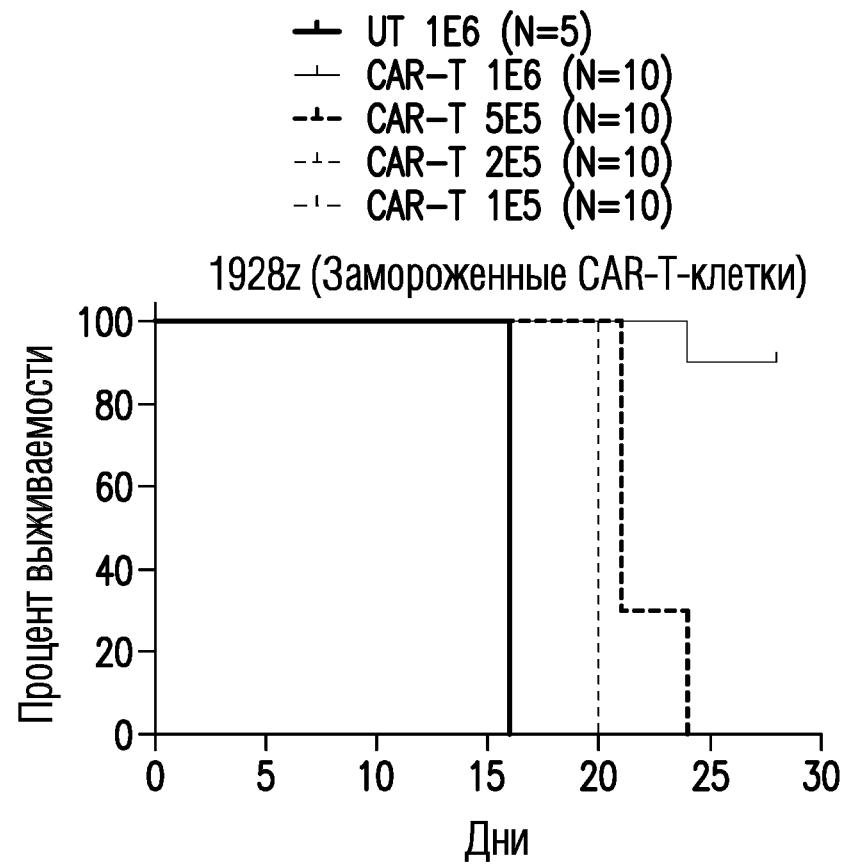
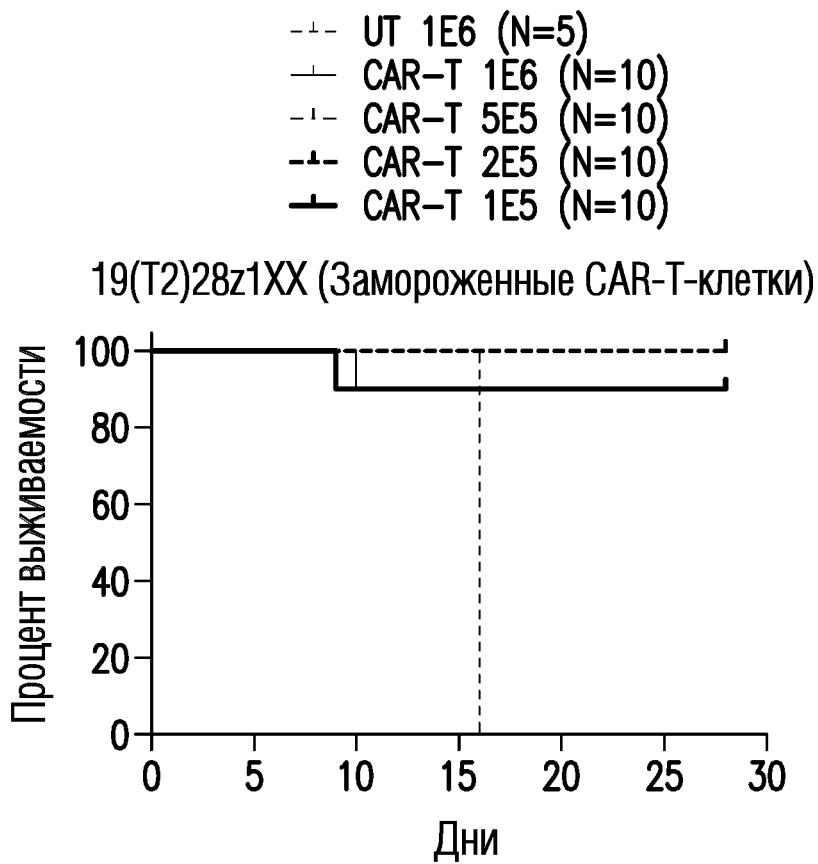
ФИГ. 14



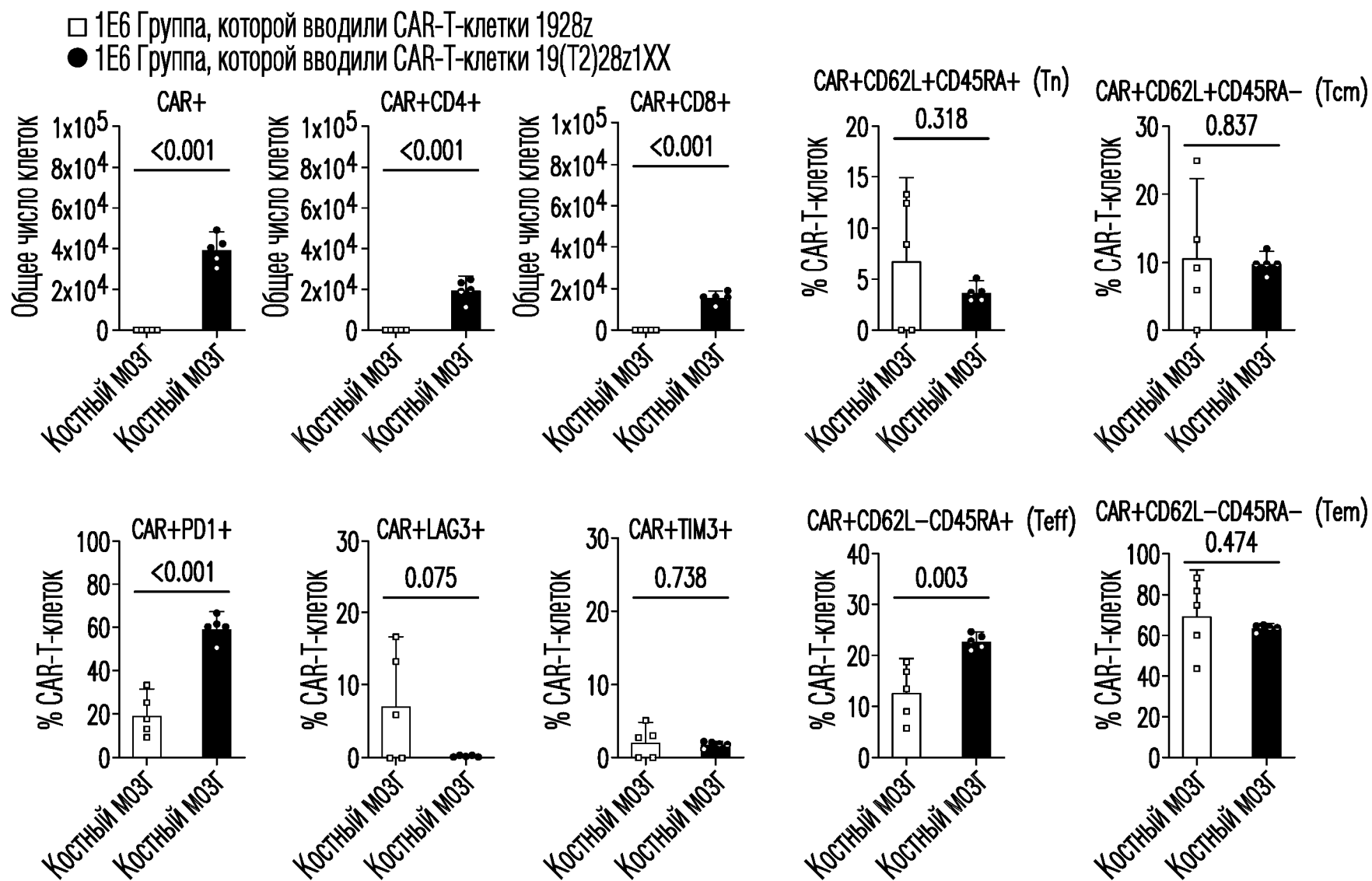
ФИГ. 14 (продолжение)



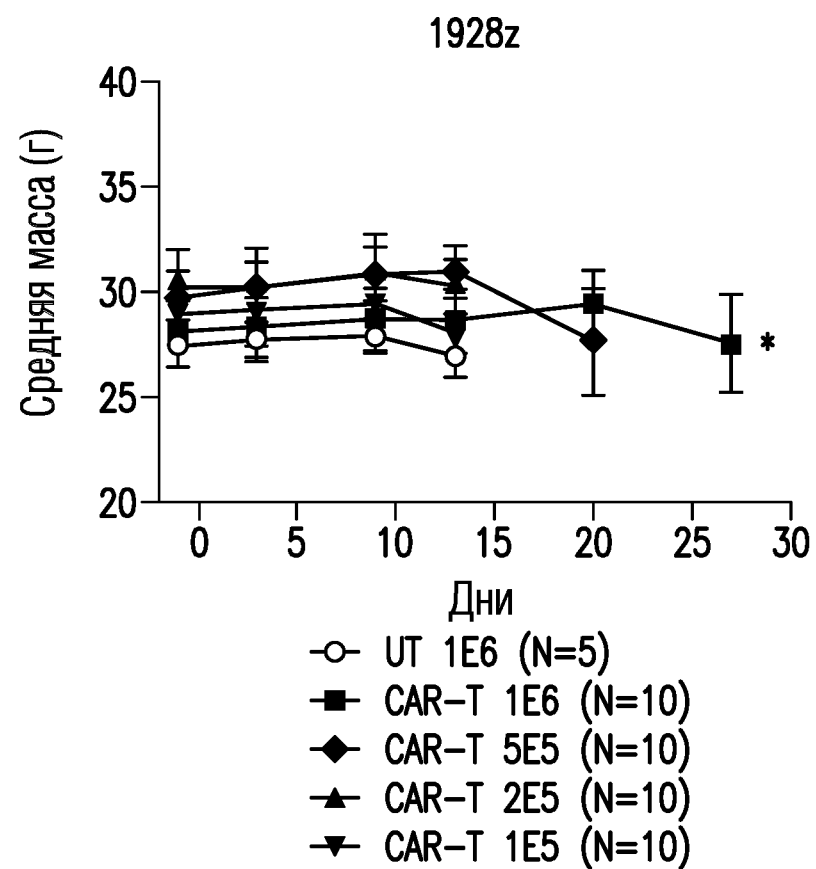
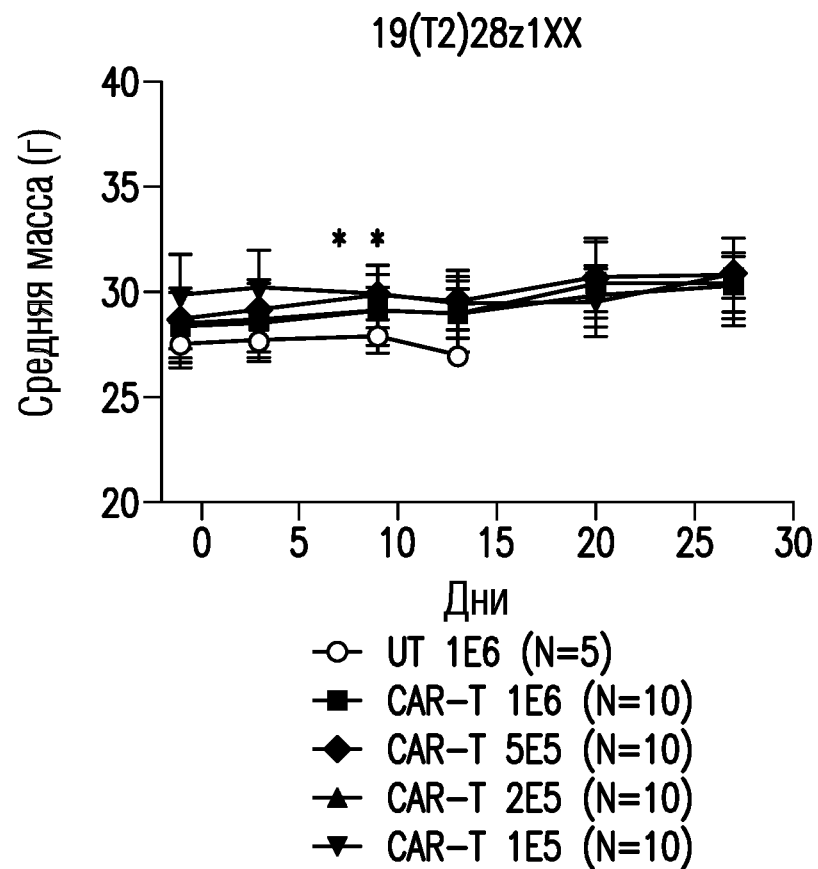
ФИГ. 15



ФИГ. 16

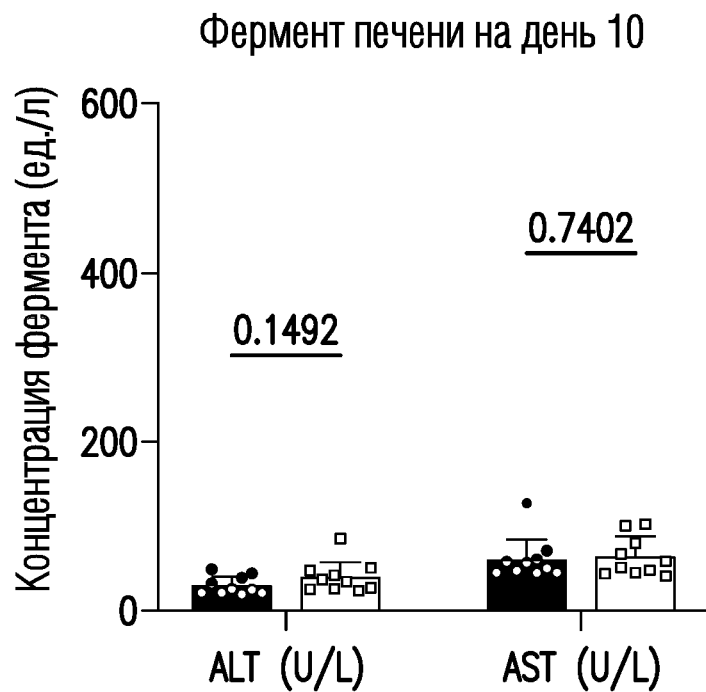


ФИГ. 17

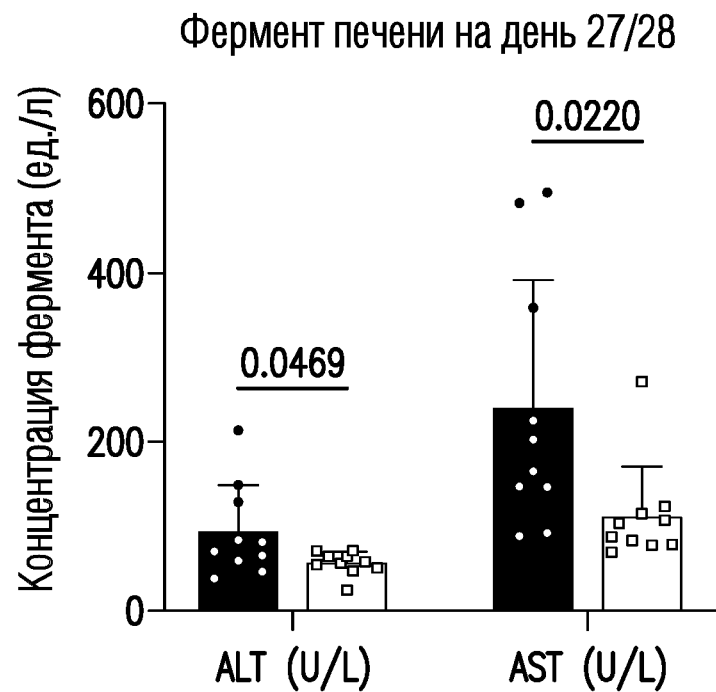


19/28

ФИГ. 18



■ Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  1928z-клеток (N=10)  
 □ Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  19(T2)28z1XX-клеток (N=10)

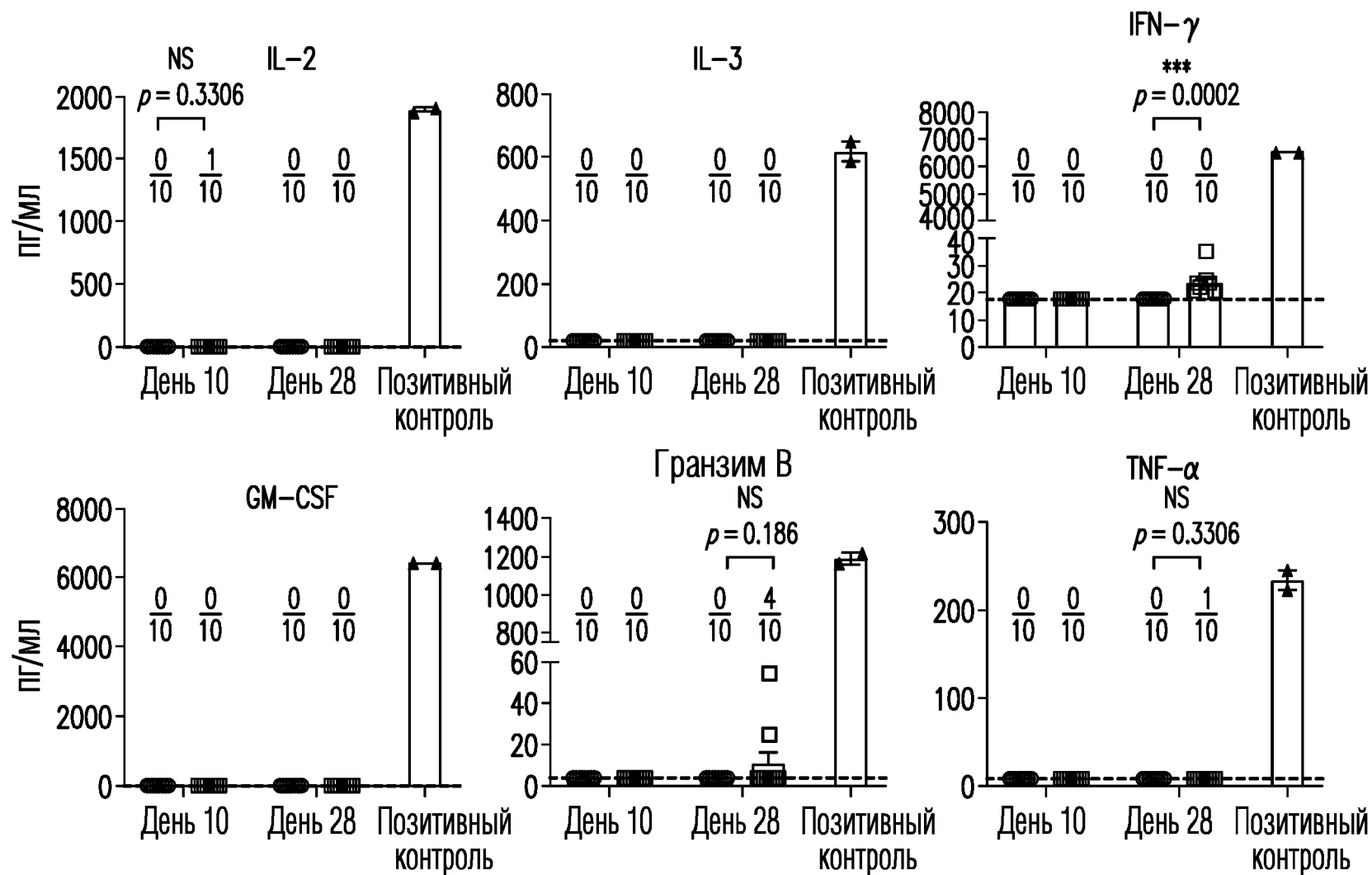


■ Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  1928z-клеток (N=10)  
 □ Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  19(T2)28z1XX-клеток (N=10)

20/28

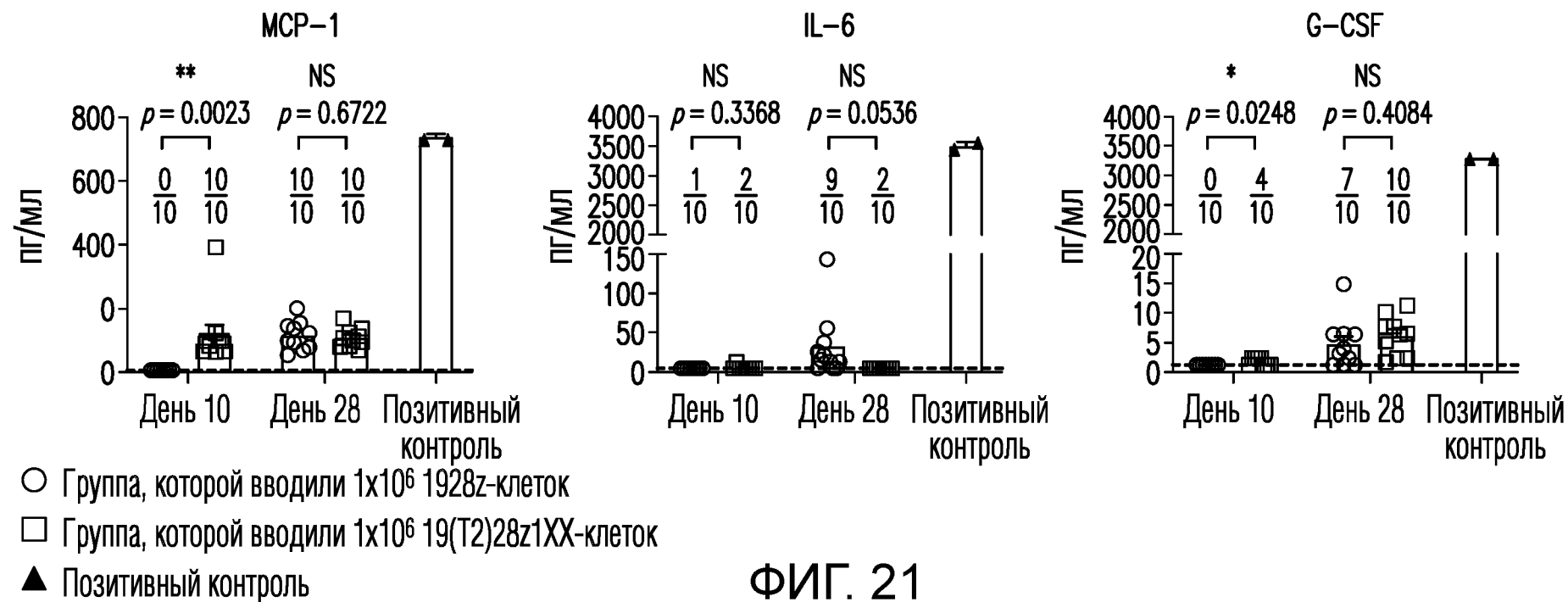
ФИГ. 19



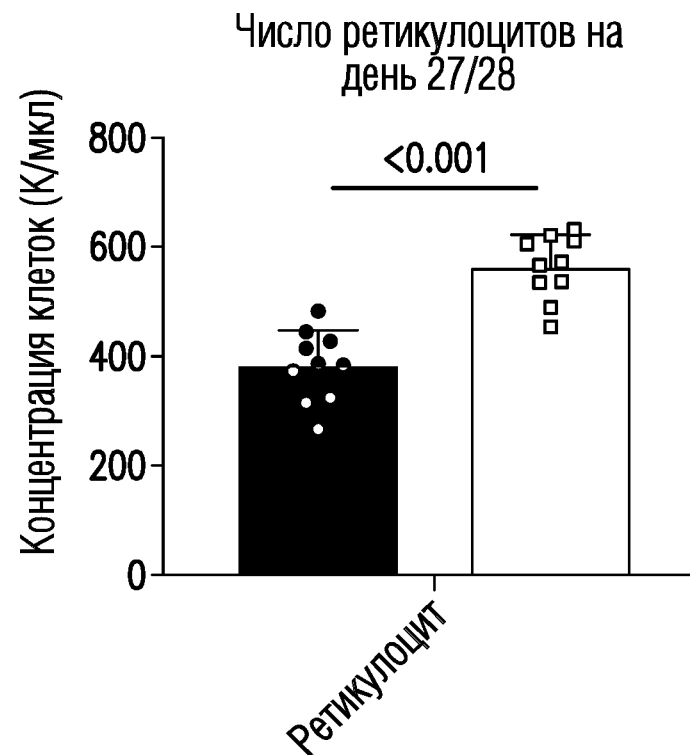
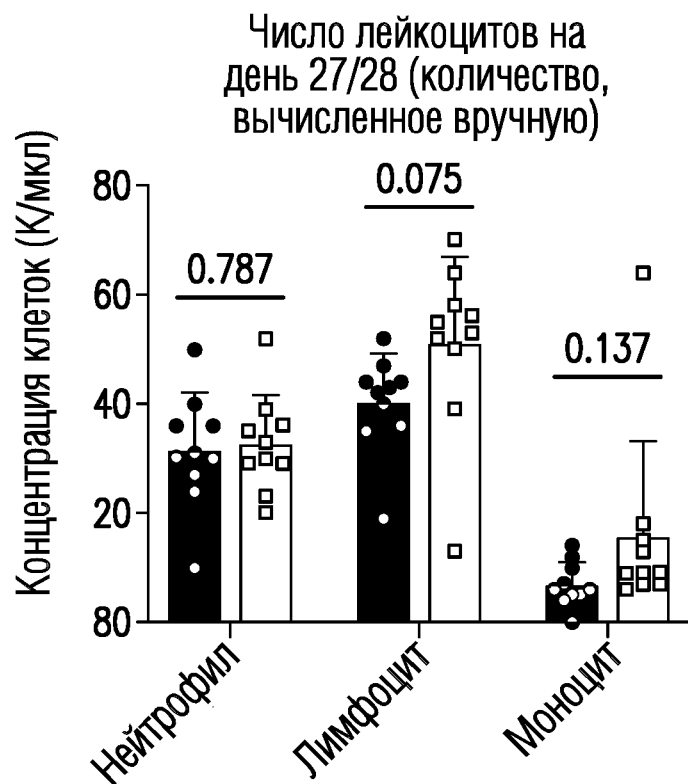


- Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  1928z-клеток
- Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  19(T2)28z1XX-клеток
- ▲ Позитивный контроль

ФИГ. 20



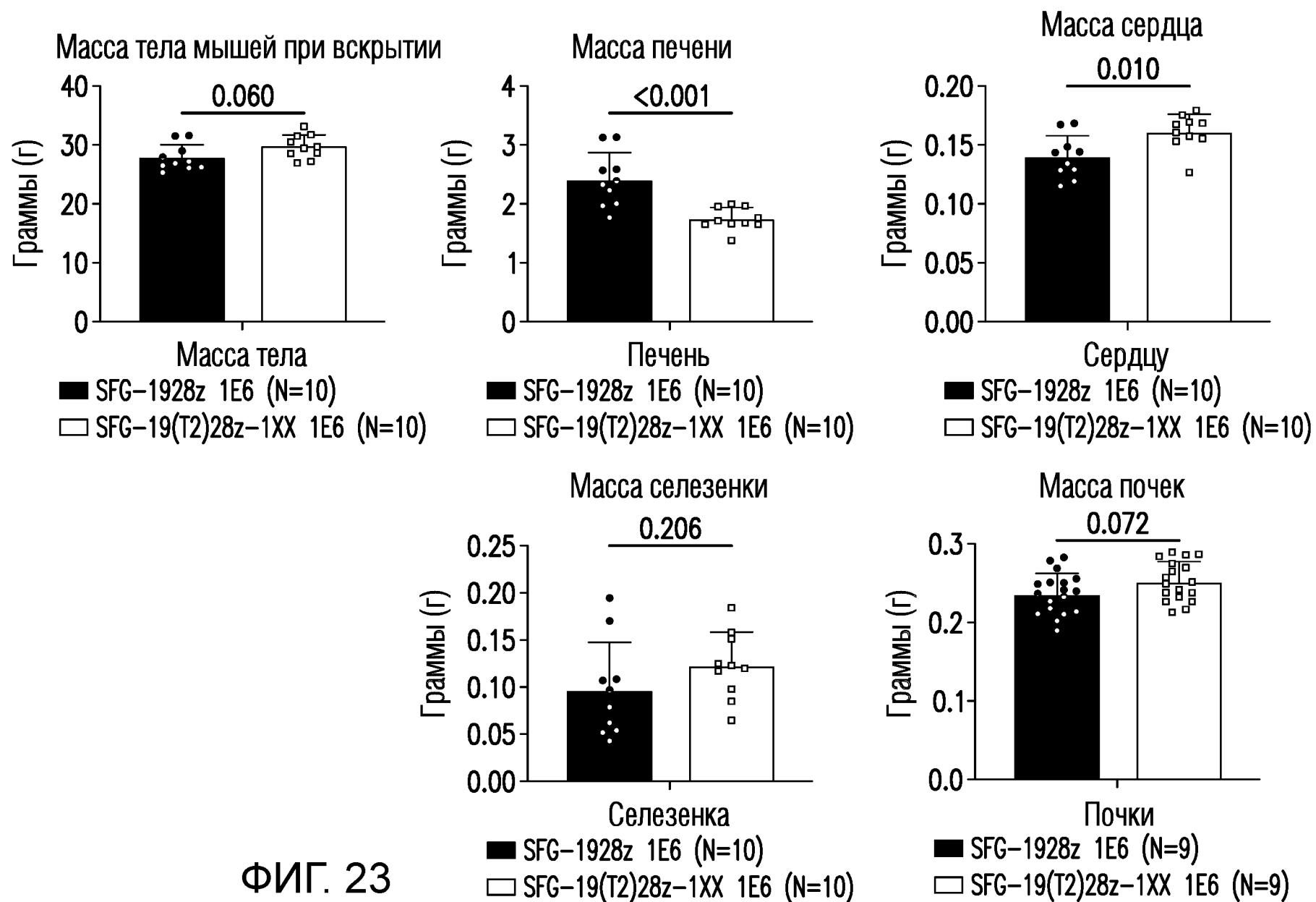
ФИГ. 21



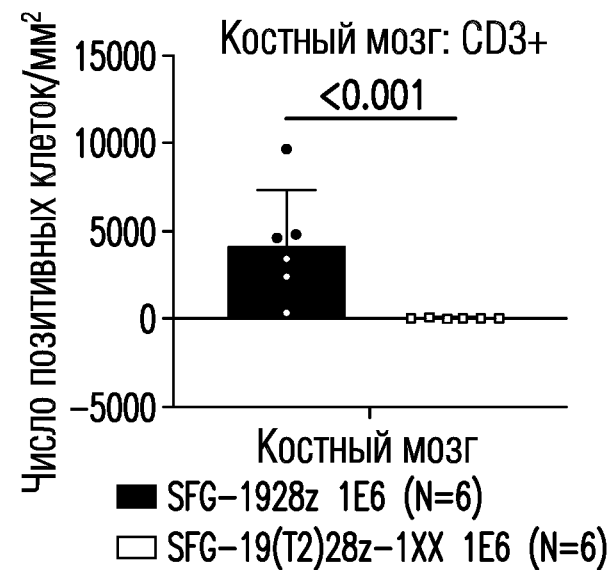
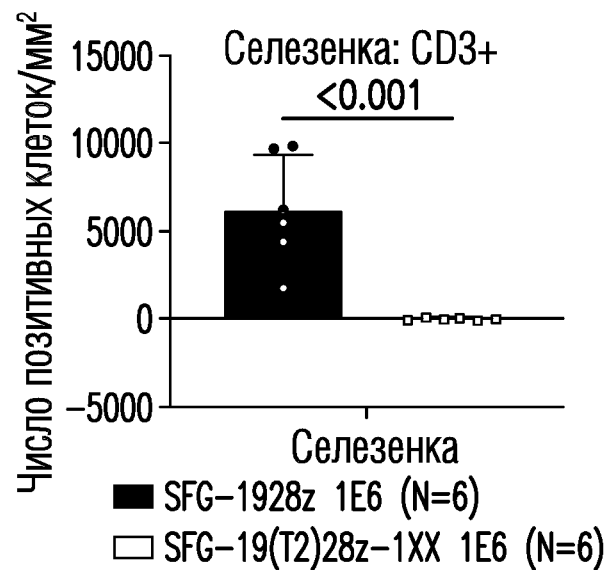
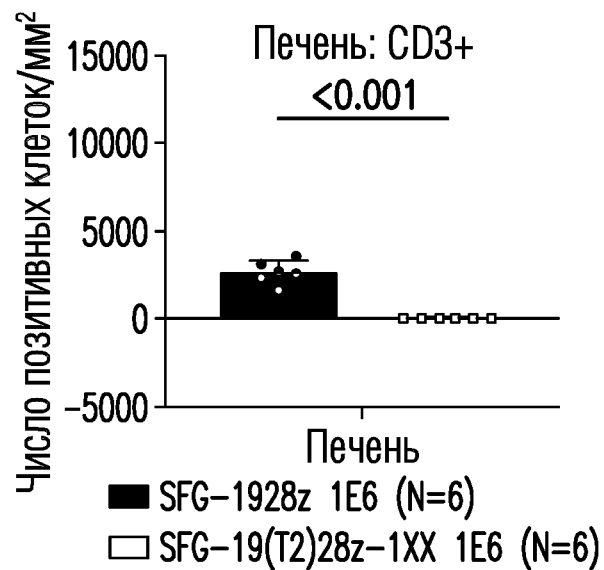
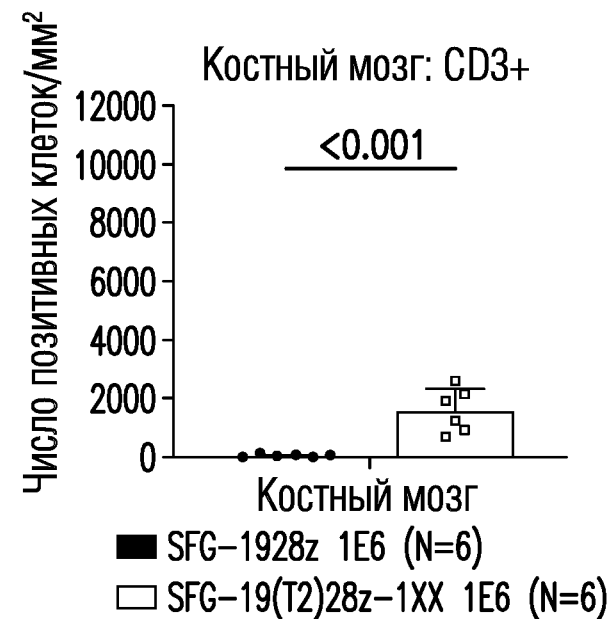
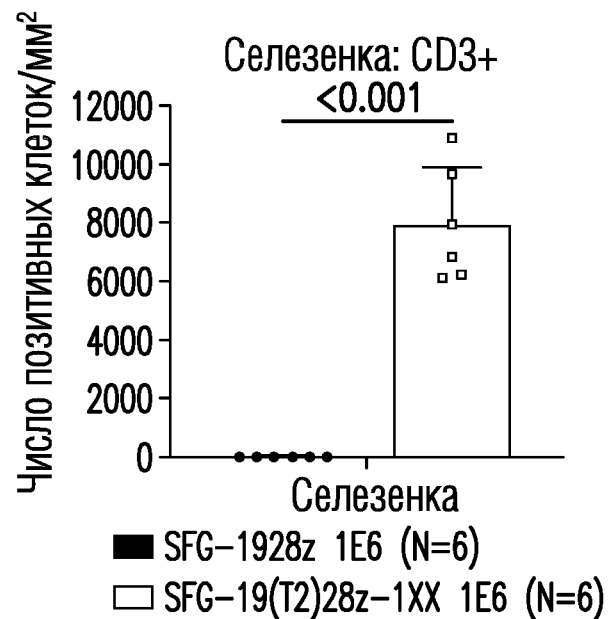
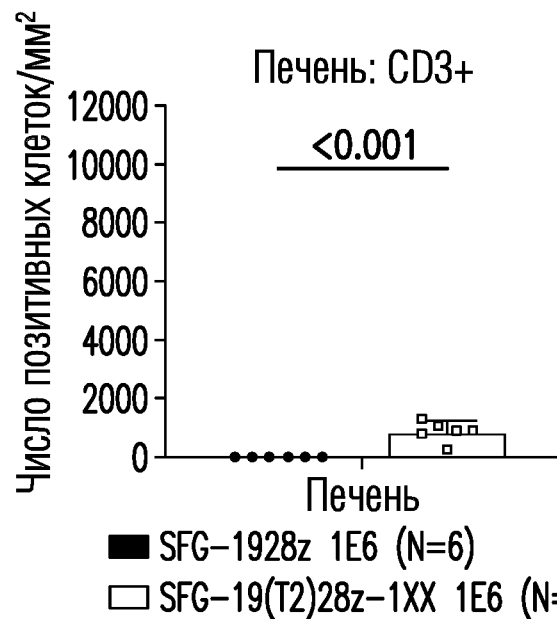
■ Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  1928z-клеток (N=10)  
 □ Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  19(T2)28z1XX-клеток (N=10)

■ Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  1928z-клеток (N=10)  
 □ Группа, которой вводили  $1 \times 10^6$  19(T2)28z1XX-клеток (N=10)

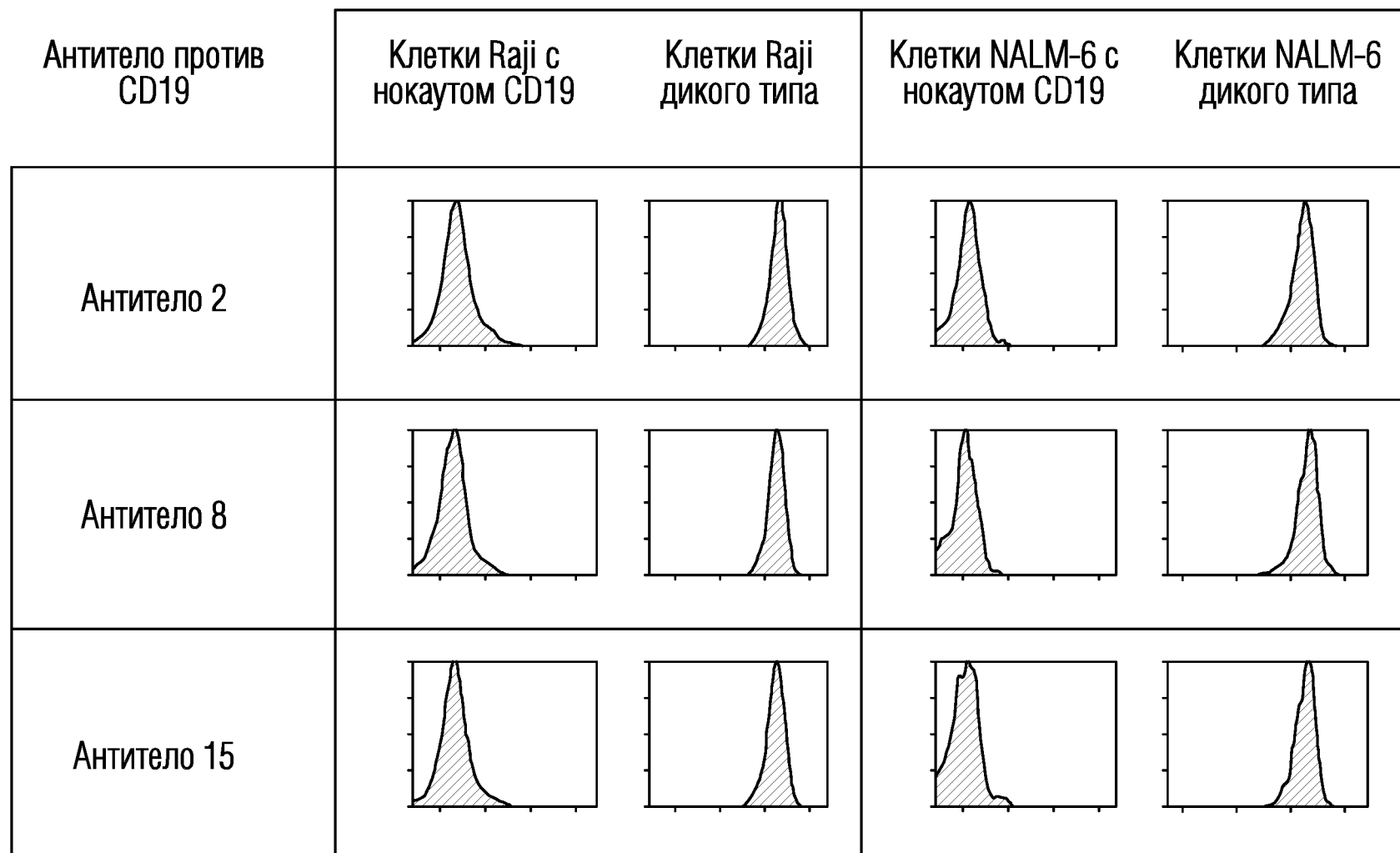
ФИГ. 22



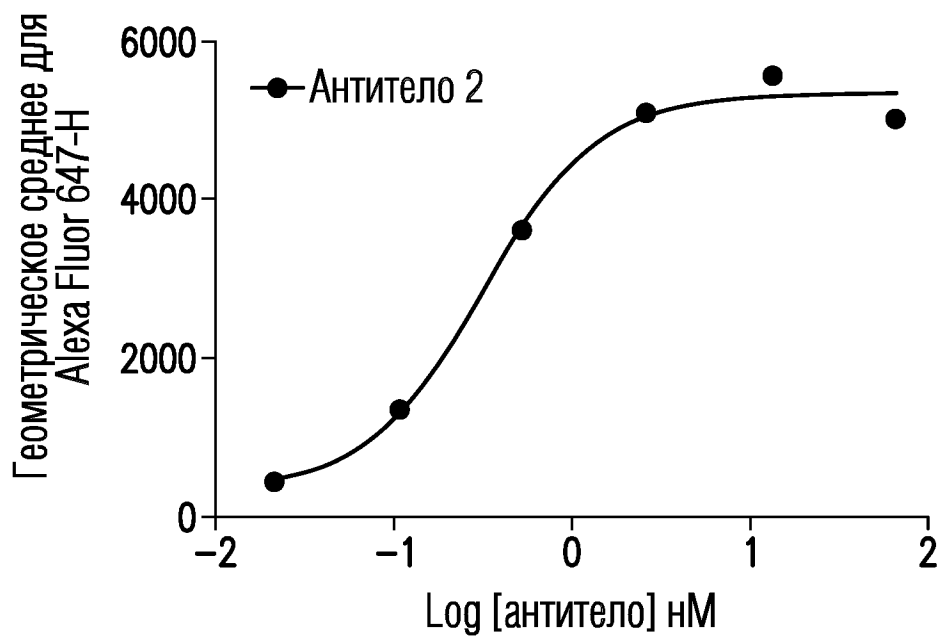
ФИГ. 23



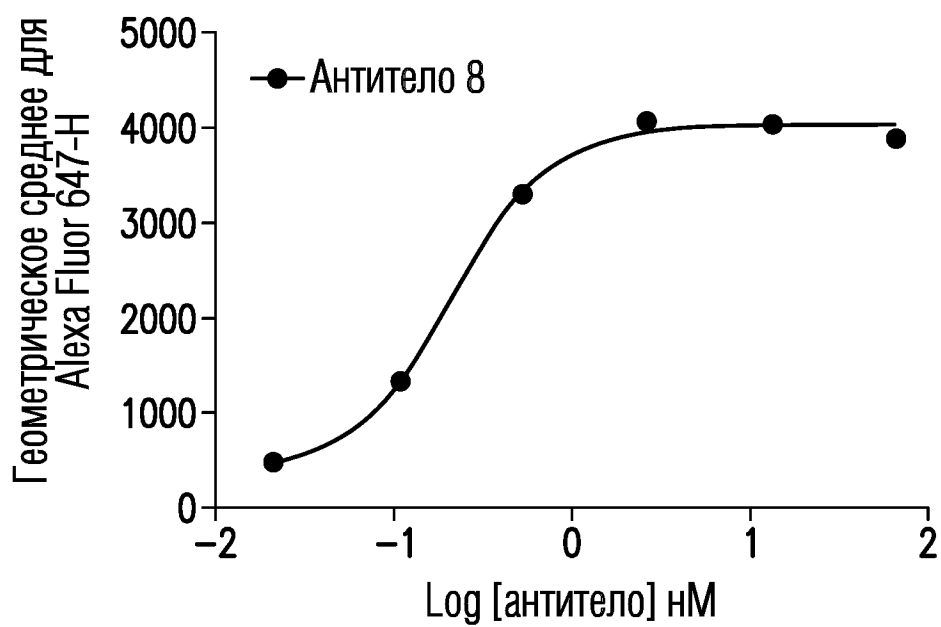
ФИГ. 24



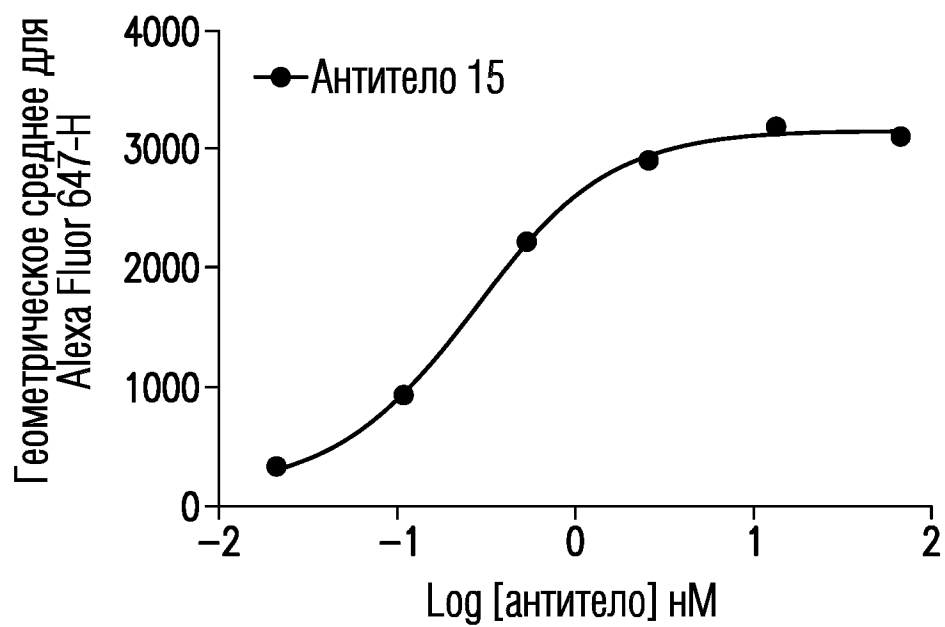
ФИГ. 25



ФИГ. 26А



ФИГ. 26В



ФИГ. 26С