

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293271** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.03.14

(51) Int. Cl. *C07K 14/725* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.12

(54) **СПЕЙСЕРЫ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

(31) 63/023,751

(72) Изобретатель:

(32) 2020.05.12

**Лажуа Марк Джозеф, Вейтцнер
Брайан Дуглас, Бойкен Скотт Эдвард,
Парк Спенсер, Сонг Юн (US)**

(33) US

(86) PCT/US2021/032098

(87) WO 2021/231655 2021.11.18

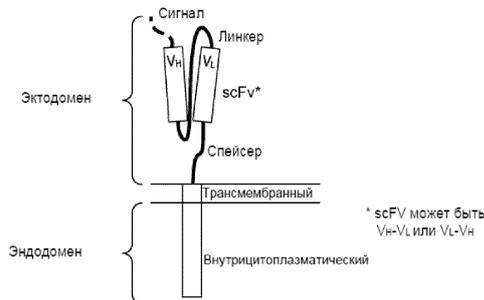
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**ЛАЙЕЛЬ ИММЬЮНОФАРМА, ИНК.
(US)**

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим спейсеры, полученные из иммуноглобулина (Ig), например шарнирные или петлевые области, их фрагменты или их комбинации. Спейсер, полученный из Ig, придает CAR улучшенные свойства, например повышенное высвобождение цитокинов по сравнению с CAR, спейсеры, которые не получены из шарнирных областей и их фрагментов, петлевых областей из константных доменов и их фрагментов, а также их комбинаций. Также предложены клетки, экспрессирующие CAR, содержащие спейсерные области, полученные из Ig, и способы применения CAR для лечения заболеваний или нарушений, например рака. Некоторые из описанных спейсеров, полученных из Ig, представляют собой фрагменты, например, из IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgM. В некоторых аспектах описанные спейсеры, полученные из Ig, получены из иммуноглобулинов нечеловеческого происхождения, например иммуноглобулинов мыши, например IgG2A. Другие описанные спейсеры, полученные из Ig, представляют собой модульные конструкции, включающие несколько соединенных шарниров Ig или их фрагментов.



A1

202293271

202293271

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576452EA/032

СПЕЙСЕРЫ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[1] Данная заявка РСТ испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/023751, поданной 12 мая 2020 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[2] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (имя: 4385_016PC01_Seqlisting_ST25.txt; размер: 2351479 байт и дата создания: 12 мая 2021 г.), поданного вместе с заявкой, полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[3] В настоящем изобретении предложены химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие спейсер, полученный из шарнирных или константных областей иммуноглобулина.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Адоптивная иммунотерапия с использованием Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), является перспективным методом лечения рака, поскольку эти клетки могут напрямую распознавать и убивать антиген-экспрессирующие опухолевые клетки независимо от человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) образом. Однако, помимо тщательного выбора антигена, ассоциированного с опухолью-мишенью, этот терапевтический подход сильно зависит от оптимального молекулярного дизайна CAR.

[5] Соответственно, существует потребность в методиках, позволяющих обеспечить планомерную оптимизацию внеклеточного спейсера в CAR для достижения максимальной эффективности CAR Т-клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] В настоящем изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где (a) спейсер имеет длину от около 150 до около 125 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å; (b) спейсер имеет длину от около 125 до около 100 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å; (c) спейсер имеет

длину от около 100 до около 75 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å; (d) спейсер имеет длину от около 75 до около 36 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å; (e) спейсер имеет длину от около 35 аминокислот до около 21 аминокислоты; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å; (f) спейсер имеет длину от около 20 до около 16 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å; (g) спейсер имеет длину от около 15 до около 11 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å; или (h) спейсер имеет длину от около 10 до около 5 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å.

[7] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где (a) спейсер имеет длину от около 450 Å до около 375 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å; (b) спейсер имеет длину от около 375 Å до около 300 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å; (c) спейсер имеет длину от около 300 Å до около 225 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å; (d) спейсер имеет длину от около 225 Å до около 100 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å; (e) спейсер имеет длину от около 100 Å до около 60 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å; (f) спейсер имеет длину от около 60 Å до около 45 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å; (g) спейсер имеет длину от около 45 Å до около 30 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å; или (h) спейсер имеет длину от около 30 Å до около 15 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å.

[8] В некоторых аспектах (a) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 или 150 аминокислот; (b) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину 100, 101,

102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 или 125 аминокислот; (с) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 аминокислот; (d) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å, а спейсер составляет 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75 аминокислот; (е) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å, а спейсер имеет длину 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислот; (f) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å, а спейсер имеет длину 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот; (g) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å, а спейсер имеет длину 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот; или (h) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å, а спейсер имеет длину 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот.

[9] В некоторых аспектах (а) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 450 Å, около 440 Å, около 430 Å, около 420 Å, около 410 Å, около 400 Å, около 390 Å, около 380 Å или около 375 Å; (b) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 375 Å, около 370 Å, около 360 Å, около 350 Å, около 340 Å, около 330 Å, около 320 Å, около 310 Å или около 300 Å; (с) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 300 Å, около 290 Å, около 280 Å, около 270 Å, около 260 Å, около 250 Å, около 240 Å, около 230 Å или около 225 Å; (d) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени менее около 15 Å, спейсер имеет длину около 225 Å, около 220 Å, около 210 Å, около 200 Å, около 190 Å, около 180 Å, около 170 Å, около 160 Å, около 150 Å, около 140 Å, около 130 Å, около 120 Å, около 110 Å или около 100 Å; (е) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å, а спейсер имеет длину около 100 Å, около 95 Å, около 90 Å, около 85 Å, около 80 Å, около 75 Å, около 70 Å, около 65 Å или около 60 Å; (f) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å, а спейсер имеет длину около 60 Å, около 55 Å, около 50 Å и около 45 Å; (g) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å, а спейсер имеет длину около 45 Å, около 40 Å, около 35 Å или около 30 Å; или (h) расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å, а спейсер имеет длину около 30 Å, около 25 Å, около 20 Å или около 15 Å.

[10] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на

опухолем антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность формулы $C_N-(X_1PRX_2P)_m-[L-(X_1PRX_2P)]_n-C_C$, где: (a) спейсер расположен между лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом CAR; (b) спейсер имеет длину по меньшей мере 15 аминокислот; (c) m представляет собой целое число, выбранное из 0 или 1; (d) n представляет собой целое число от 1 до 20; (e) L представляет собой последовательность линкерного полипептида; (f) C_N представляет собой необязательную N-концевую кэпирующую последовательность; (g) C_C представляет собой необязательную C-концевую кэпирующую последовательность; и (h) X_1 и X_2 независимо выбраны из цистеина, глицина, аланина или серина.

[11] В некоторых аспектах спейсер содержит два, три, четыре, пять или шесть мотивов X_1PRX_2P . В некоторых аспектах X_1PRX_2P содержит по меньшей мере один цистеин. В некоторых аспектах X_1PRX_2P представляет собой SEQ ID NO:4749. В некоторых аспектах L содержит полипептид SEQ ID NO: 4223 или его фрагмент или вариант. В некоторых аспектах, когда $n>1$, все L идентичны. В некоторых аспектах, когда $n>1$, по меньшей мере один L отличается от другого L . В некоторых аспектах C_N содержит полипептид SEQ ID NO: 4088 или его фрагмент или вариант.

[12] В некоторых аспектах C_C содержит полипептид SEQ ID NO: 4533 или его фрагмент или вариант. В некоторых аспектах спейсер CAR содержит последовательность формулы $(CPRCP)_o(EPKSCDTPPPCPRCP)_p$, где o представляет собой целое число, равное 0 или 1, и p представляет собой целое число, равное 1, 2 или 3, где $CPRCP$ представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4740, и где $EPKSCDTPPPCPRCP$ представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4477.

[13] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2813, 2903, 2983, 3358, 3728, и 4477.

[14] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит кэпирующую последовательность C_C , содержащую подпоследовательность полипептида SEQ ID NO: 4533 или его фрагмент или вариант. В некоторых аспектах подпоследовательность полипептида SEQ ID NO: 5 представляет собой N-концевую AP. В некоторых аспектах спейсер CAR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около

70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4833, 4834, 4835, 4836, 4837, и 4838.

[15] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит копирующую последовательность C_N, содержащую подпоследовательность полипептида SEQ ID NO: 4088 или его фрагмент или вариант. В некоторых аспектах спейсер CAR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4833.

[16] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального фрагмента, при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4841.

[17] В данном изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального фрагмента, при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4839.

[18] Также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального

фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность формулы $(EX_3KX_4X_5X_6X_7DTX_8X_9X_{10}TCPRCP)_q$, где q представляет собой целое число от 1 до 10, и где: X_3 представляет собой L или P; X_4 представляет собой T или S; X_5 представляет собой P или C; X_6 представляет собой L или отсутствует; X_7 представляет собой G или отсутствует; X_8 представляет собой T или P; X_9 представляет собой H или P; и X_{10} представляет собой T или P.

[19] Также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального фрагмента, где спейсер содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность A с SEQ ID NO: 4466 и/или по меньшей мере одна аминокислотная последовательность B с SEQ ID NO: 4477, где аминокислотная последовательность спейсера CAR соответствует формуле A, B, AB, ABB, ABVV, AVVVV, AVVVVV, AVVVVVV, AA, AAA, AAAA, AAAAA, BB, BBB, BBBB, или VVVVV.

[20] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей в Таблице 11, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в Таблице 11.

[21] В некоторых аспектах спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG3, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG3. В некоторых аспектах N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG3, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG3, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в Таблице 12.

[22] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий

CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 1.

[23] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2015, 1889, 1768, 4852 и любой их комбинации.

[24] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей в **Таблице 1**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 1**.

[25] В некоторых аспектах спейсер CAR дополнительно содержит (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgD, и/или (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgD. В некоторых аспектах аминокислоты C-концевого домена последовательности CH1 и CH2 IgD и/или аминокислоты N-концевого домена последовательности CH1 и CH2 IgD содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблице 2**.

[26] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между

антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2560.

[27] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в Таблице 3, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в Таблице 3. В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4847, 4845, 4846, 2560, 4844, и любой их комбинации.

[28] В некоторых аспектах спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA1, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA1. В некоторых аспектах N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA1, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA1, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в Таблице 4.

[29] В настоящем изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 4848.

[30] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%,

по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4523, 4850, 2713, 4524, 4525, и любой их комбинации.

[31] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в Таблице 5, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в Таблице 5. В некоторых аспектах спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена CH1 IgA2, и/или С-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA2. В некоторых аспектах N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена CH1 IgA2, и/или С-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA2, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в Таблице 6.

[32] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2723 или SEQ ID NO: 4843.

[33] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4839, 4840, 4843, и любой их комбинации. В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в Таблице 7, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в Таблице 7. В

некоторых аспектах спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена CH1 IgG1, и/или С-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG1. В некоторых аспектах N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена CH1 IgG1, и/или С-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG1, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблице 8**.

[34] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2768 или SEQ ID NO: 4842.

[35] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4842. В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 9А**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 9А**. В некоторых аспектах спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена CH1 IgG2, и/или С-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2. В некоторых аспектах, N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена CH1 IgG2, и/или С-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблице 10А**.

[36] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii)

трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 4926.

[37] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4830, 4831, 4832, и любой их комбинации.

[38] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в Таблице 9B, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 9B**. В некоторых аспектах спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG2, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2. В некоторых аспектах N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG2, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблице 10B**.

[39] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 4374.

[40] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%,

по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4856. В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 15**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 15**. В некоторых аспектах спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgE, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgE. В некоторых аспектах N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgE, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgE, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблице 16**.

[41] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 4857.

[42] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 4858, 4959, 4857, и любой их комбинацией.

[43] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 17**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 17**. В некоторых

аспектах спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgM, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgM. В некоторых аспектах N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgM, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgM, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблице 18**. В некоторых аспектах спейсер CAR содержит необязательный линкер L1 и/или необязательный линкер L2. В некоторых аспектах необязательный линкер L1 и/или необязательный линкер L2 представляет собой гибкий линкер. В некоторых аспектах необязательный линкер L1 и/или необязательный линкер L2 имеет длину от 1 до 100 аминокислот. В некоторых аспектах длина линкера L1 составляет от 1 до 10 аминокислот. В некоторых аспектах линкер L1 включает линкер Gly-Ser. В некоторых аспектах линкер L1 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4818. В некоторых аспектах длина линкера L2 составляет от 1 до 10 аминокислот. В некоторых аспектах L2 содержит последовательность PGG. В некоторых аспектах шарнирная область иммуноглобулина человека получена из IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 или IgM. В некоторых аспектах функциональный фрагмент шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека содержит (a) внутреннюю подпоследовательность шарнирной и/или константной области; (b) C-концевую подпоследовательность шарнирной и/или константной области; (c) N-концевую подпоследовательность шарнирной и/или константной области; (d) шарнирную область, которая удлинена на 1-10 аминокислот в сторону N-концевого домена CH1 и/или C-концевого домена CH2; (e) подпоследовательность шарнирной области, которая удлинена на 1-10 аминокислот в направлении N-концевого домена CH1; (f) подпоследовательность шарнирной области, которая удлинена на 1-10 аминокислот в направлении C-концевого домена CH2; (g) последовательность, содержащую 2 или более повторов (a)-(f); (h) комбинацию (a)-(g), соответствующую одной и той же шарнирной и/или константной области; (i) комбинацию (a)-(g), соответствующую разным шарнирным и/или константным областям; или (j) любую их комбинацию. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени оценивают с помощью рентгеновской кристаллографии, ЯМР или крио-ЭМ структуры. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени оценивают с использованием метода резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). В некоторых аспектах CAR индуцирует повышенную экспрессию IFN γ и/или IL-2 по сравнению с соответствующим CAR, содержащим эталонный спейсер. В некоторых аспектах CAR индуцирует увеличение экспрессии IFN γ в по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около

10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз по сравнению с соответствующим CAR, содержащим эталонный спейсер. В некоторых аспектах CAR индуцирует увеличение экспрессии IL-2 в по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз по сравнению с соответствующим CAR, содержащим эталонный спейсер. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом на опухолевом антигене. В некоторых аспектах опухолевый антиген включает ROR1, HER2, AFP, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелин, IL-1 IRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюис Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатный рецептор альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазу, PAP, ELF2M, эфрин B2, рецептор IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназу, EphA2, фукозил GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатный рецептор альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловую кислоту, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WTI, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаин, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белок спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-родственный антиген 1, p53, мутант p53, протеин, сурвивин и теломеразу, PCTA- 1/галектин 8, MelanA/MART1, мутант Ras, hTERT, точки разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитый ген ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогеновый рецептор, циклин B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2, кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, внеклеточную часть белка APRIL и любые их комбинации.

[44] В некоторых аспектах опухолевый антиген включает ROR1, CD19 или Her2. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит антитело к ROR1 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен перекрестно конкурирует с антителом R11, антителом R12 или антителом 2A2. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом, что и антитело R11, антитело R12 или антитело 2A2. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH) из антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2. В некоторых аспектах

антигенсвязывающий домен дополнительно содержит CDR1 VH и CDR2 VH. В некоторых аспектах CDR1 VH включает CDR1 VH антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2, и/или CDR2 VH включает CDR2 VH из антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен дополнительно содержит CDR1 варибельной области легкой цепи (VL), CDR2 VL и/или CDR3 VL. В некоторых аспектах CDR1 VL включает CDR1 VL из антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2, CDR2 VL включает CDR2 VL из антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2, и/или CDR3 VL включает CDR3 VL из антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит: (i) CDR1 VH с SEQ ID NO: 4888; CDR2 VH с SEQ ID NO: 4889; и CDR3 VH с SEQ ID NO: 4890; и/или CDR1 VL с SEQ ID NO: 4892; CDR2 VL с SEQ ID NO: 4893; и CDR3 VL с SEQ ID NO: 4894; (ii) CDR1 VH с SEQ ID NO: 4896; CDR2 VH с SEQ ID NO: 4897; и CDR23 VH с SEQ ID NO: 4898; и/или CDR1 VL с SEQ ID NO: 4900; CDR2 VL с SEQ ID NO: 4901; и CDR3 VL с SEQ ID NO: 4902; или (iii) CDR1 VH с SEQ ID NO: 4904; CDR2 VH с SEQ ID NO: 4905; и CDR23 VH с SEQ ID NO: 4906; и/или CDR1 VL с SEQ ID NO: 4908; CDR2 VL с SEQ ID NO: 4909; и CDR3 VL с SEQ ID NO: 4910.

[45] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL), где: (i) VH включает SEQ ID NO: 4887; или VL включает SEQ ID NO: 4891; (ii) VH включает SEQ ID NO: 4895; или VL включает SEQ ID NO: 4899; или (iii) VH включает SEQ ID NO: 4903; или VL включает SEQ ID NO: 4907. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен содержит VH, включающую SEQ ID NO: 4895, и VL, включающую SEQ ID NO: 4899; и при этом спейсер состоит из SEQ ID NO: 4830. В некоторых аспектах CAR разработан как стандартный CAR, разделенный CAR, CAR с выключенным переключателем, CAR с включенным переключателем, CAR первого поколения, CAR второго поколения, CAR третьего поколения или CAR четвертого поколения. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен представляет собой IgNAR, Fab, Fab', F(ab)'₂, F(ab)'₃, Fv, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), бис-scFv, (scFv)₂, миниантитело, диатело, триатело, тетратело, интратело, стабилизированный дисульфидом белок Fv (dsFv), моноантитело, наноантитело, аффитело, DARPin, монотело, аднектин, альфатело или разработанное связывающее вещество. В некоторых аспектах внутриклеточный домен CAR представляет собой сигнальный домен, полученный из CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит костимулирующий домен, полученный из 2B4, HVEM, ICOS, LAG3, DAP10, DAP12, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), глюкокортикоид-индуцированного рецептора фактора некроза опухоли (GITR), лимфоцитарного функционального антигена-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C или B7-H3.

[46] В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК. В некоторых аспектах трансмембранный домен связан с внутриклеточным

доменом с помощью линкера. В некоторых аспектах CAR является биспецифическим CAR. В некоторых аспектах CAR является индуцируемым CAR.

[47] Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему описанный в данном документе полинуклеотид, функционально связанный с регуляторным элементом. В некоторых аспектах вектор представляет собой вирусный вектор, вектор млекопитающего или бактериальный вектор. В некоторых аспектах вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, лентивирусного вектора, вектора на основе вируса Сендай, бакуловирусного вектора, вектора на основе вируса Эпштейна-Барра, паповавирусного вектора, вектора на основе вируса осповакцины, вектора на основе вируса простого герпеса, гибридного вектора и вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых аспектах вектор представляет собой лентивирус.

[48] В настоящем изобретении также предложена композиция, содержащая описанный в данном документе полинуклеотид или описанный в данном документе вектор. Также предложен набор, содержащий полинуклеотид, вектор или композицию, описанные в данном документе. Также предложен CAR, кодируемый одной или более полинуклеотидными последовательностями или вектором, описанными в данном документе. Также предложена клетка, генетически модифицированная для экспрессии CAR, содержащая полинуклеотид или вектор, описанные в данном документе. В некоторых аспектах клетка представляет собой Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK), естественную Т-клетку-киллер (NKT), ИЛС-клетку, макрофаг или антигенпрезентирующую клетку.

[49] В настоящем изобретении предложена композиция, содержащая CAR, описанную в данном документе, или клетку, описанную в данном документе. В настоящем изобретении также предложена описанная в данном документе композиция для лечения субъекта, нуждающегося в CAR-терапии. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая клетку или композицию, описанную в данном документе, для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. Также предложен набор, содержащий CAR, клетку, композицию или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе.

[50] В настоящем изобретении также предложено применение полинуклеотида, вектора, композиции, набора, CAR, клетки, фармацевтической композиции или набора, описанных в данном документе, для производства лекарственного препарата для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. Также предложен способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на популяцию клеток-мишеней или ткань у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества описанных в данном документе клеток. Также предложен способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клеток, описанных в данном документе. Также предложен

способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества клеток, описанных в данном документе. Также предложен способ получения популяции клеток для терапии, включающий трансдукцию популяции клеток, выделенных от субъекта, полинуклеотидом или вектором, описанными в данном документе. В некоторых аспектах трансдукция включает культивирование клетки в подходящих условиях.

[51] В настоящем изобретении также предложен способ получения персистирующей популяции генетически сконструированных клеток у субъекта, у которого диагностировано злокачественное новообразование, причем способ включает введение субъекту клетки, генетически сконструированной для экспрессии CAR, описанного в данном документе. Также предложен способ экспансии популяции генетически сконструированных клеток у субъекта, у которого диагностировано злокачественное новообразование, причем способ включает введение субъекту клетки, генетически сконструированной для экспрессии CAR, описанного в данном документе. В некоторых аспектах клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых аспектах клетка представляет собой аутологичную Т-клетку. В некоторых аспектах субъект представляет собой человека.

[52] В настоящем изобретении также предложен способ улучшения одного или более свойств CAR-терапии, включающий вставку спейсера CAR между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом CAR, где спейсер CAR представляет собой спейсер, указанный в полинуклеотиде, описанном в данном документе. Также предложен способ улучшения одного или более свойств терапии CAR, включающий вставку спейсера CAR между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом CAR, где спейсер CAR представляет собой спейсер, указанный в полинуклеотиде, описанном в данном документе, где спейсер расположен между лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых аспектах спейсер CAR представляет собой спейсер, указанный в полинуклеотиде, описанном в данном документе. В некоторых аспектах одним или более улучшенными свойствами CAR-терапии является повышенная секреция одного или более цитокинов. В некоторых аспектах секреция цитокинов, индуцированная CAR, увеличивается по сравнению с секрецией, наблюдаемой после введения соответствующего CAR, содержащего эталонный спейсер. В некоторых аспектах цитокин представляет собой интерлейкин. В некоторых аспектах интерлейкин представляет собой интерлейкин-2. В некоторых аспектах цитокин представляет собой интерферон. В некоторых аспектах интерферон представляет собой интерферон-гамма.

[53] В настоящем изобретении также предложен способ конструирования спейсера CAR, включающий измерение расстояния между эпитопом-мишенью и поверхностью клетки-мишени, где последовательность спейсера представляет собой шарнирную последовательность Ig, ее подпоследовательность или их комбинацию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ/ФИГУР

[54] **Фиг. 1.** Схематическое представление CAR, демонстрирующее его доменную организацию. Настоящее изобретение относится к разработке внеклеточного спейсерного компонента CAR. Связывающий домен может представлять собой, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) в ориентации V_H-V_L или V_L-V_H , или любую антигенсвязывающую часть антитела или их комбинацию. Эктодомен содержит антигенсвязывающий домен и спейсер CAR. Эндодомен также может называться внутриклеточным или внутрицитоплазматическим доменом и содержит ITAM и необязательные костимулирующие модули.

[55] **Фиг. 2.** Схематическое представление, демонстрирующее различия в структуре между разными поколениями CAR. CAR первого поколения содержат антигенсвязывающий домен (например, scFv), соединенный с ITAM напрямую через трансмембранную область. CAR второго поколения содержат костимулирующую молекулу (CM1), расположенную между ITAM и трансмембранным доменом. CAR третьего поколения включают дополнительную костимулирующую молекулу (CM2). В CAR четвертого поколения костимулирующая молекула заменена индуктором IL-12. CAR пятого поколения основаны на CAR второго поколения, но содержат укороченный цитоплазматический домен β -цепи рецептора IL-2.

[56] **Фиг. 3.** Схематическое представление архитектуры иммуноглобулинов человека.

[57] **Фиг. 4.** Схематическое представление, демонстрирующее доменные структуры IgA1 и IgA2.

[58] **Фиг. 5.** Схематическое представление IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[59] **Фиг. 6.** Повторы последовательности (a или b), присутствующие (+) или отсутствующие (-) в различных аллотипах IgG3. Единственными встречающимися в природе последовательностями являются ab, abb и abbb.

[60] **Фиг. 7.** Схематическое представление взаимосвязи между длиной спейсера, расстоянием между эпитопом-мишенью и поверхностью мембраны клетки-мишени и шириной сигнального синапса.

[61] **Фиг. 8.** Схематическое представление модульной структуры шарнира IgG3 и библиотеки модульных спейсеров различной длины и состава, полученных из шарнира IgG3.

[62] **Фиг. 9.** Перечень спейсеров, полученных из иммуноглобулина, использованных в примерах (спейсеры 1-11 и спейсеры 13-31). Каждый спейсер может содержать необязательную последовательность гибкого линкера Gly-Ser (показана иллюстративная последовательность линкера GLy-Ser с SEQ ID NO: 4818; в некоторых аспектах линкер может представлять собой SEQ ID NO: 5088). В таблицах показана длина каждого спейсера в аминокислотах и теоретическая удлиненная длина конформации в ангстремах (только спейсер или спейсер плюс линкер). В таблицах также указано, присутствуют ли цистеины.

[63] **Фиг. 10.** Гистограмма, демонстрирующая количественную оценку уровней

секреции IFN- γ через 24 часа Т-клетками, экспрессирующими CAR к ROR1 с указанными спейсерами, и контрольными (нетрансдуцированными) Т-клетками в отсутствие антигена-мишени. R12-CART-клетки трансдуцировали R12CAR-P2A-EGFRt. R12CAR: CAR, направленный против ROR1 человека. P2A: саморасщепляющийся пептид. EGFRt: укороченный человеческий EGFR, содержащий внеклеточные домены III и IV EGFR и трансмембранный домен EGFR, но лишенный доменов I и II EGFR и внутриклеточной последовательности EGFR. «Короткий» эталонный спейсер означает спейсер IgG4 с SEQ ID NO: 4911.

[64] **Фиг. 11А.** График, обобщающий влияние указанных спейсеров на секрецию IL-2 и IFN- γ R12-CART-клетками во время 24-часового совместного культивирования с клетками H1975, экспрессирующими ROR1 человека. R12-CART-клетки трансдуцировали R12CAR-P2A-EGFRt.

[65] **Фиг. 11В.** Графики, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на секрецию IL-2 и IFN- γ R12-CART-клетками во время 24-часового совместного культивирования с клетками H1975, экспрессирующими ROR1 человека. R12-CART-клетки трансдуцировали R12CAR-P2A-EGFRt.

[66] **Фиг. 11С.** Графики, обобщающие корреляцию между целевыми литическими способностями и профилями высвобождения цитокинов Т-клетками, экспрессирующими R12-CAR с указанными спейсерами, во время совместного культивирования с клетками H1975, экспрессирующими человеческий ROR1. Целевые литические способности измеряли путем интегрирования площади под нормализованными кривыми уничтожения клеток-мишеней (т.е. площади под кривой или AUC). R12-CART-клетки трансдуцировали R12CAR-P2A-EGFRt.

[67] **Фиг. 12А, 12В, 12С и 12D.** Графики, обобщающие эффекты указанных спейсеров, разделенных семействами антител, из которых произошли спейсеры, на долговременную цитотоксическую активность R12-CART-клеток после многократного воздействия клеток Jeko1, экспрессирующих человеческий ROR1. Активность контрольных (нетрансдуцированных) Т-клеток включена в каждый график для сравнения. Количество оставшихся клеток Jeko1 в течение 3 раундов совместного культивирования с R12-CART-клетками нормализовали к первой временной точке каждого раунда (т. е. 0 ч, 68 ч и 148 ч). R12-CART-клетки трансдуцировали R12CAR-P2A-EGFRt.

[68] **Фиг. 12Е.** Длины первых пяти спейсеров (спейсеров 1, 11, 13, 14 и коротких), выбранных на основании долгосрочной цитотоксической активности, измеренной на Фиг. 12А, 12В, 12С и 12D.

[69] **Фиг. 13А и 13В.** Процент трансдуцированных клеток, измеренный по поверхностной экспрессии маркера трансдукции EGFRt на первичных Т-клетках у доноров D3868 (**Фиг. 13А**) и D4869 (**Фиг. 13В**).

[70] **Фиг. 13С и 13D.** Средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) для связанного белка против FMC63 на живых трансдуцированных клетках (EGFRt+ клетки) у донора D3868 (**Фиг. 13С**) и донора D4869 (**Фиг. 13D**). Треугольники указывают на уменьшение

длины спейсера в пределах данного типа иммуноглобулина.

[71] **Фиг. 14А-14Е.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную FMC63-CAR-T, в присутствии клеток-мишеней Raji с красной меткой NucLight (Raji-NLR), экспрессирующих целевой антиген CD19 человека у донора D3868. На **Фиг. 14А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 14В** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 14А**. На **Фиг. 14С-14Е** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (**Фиг. 14С**), IL-2 (**Фиг. 14D**) и TNF α (**Фиг. 14Е**) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. «Короткий» эталонный спейсер представляет собой спейсер, полученный из шарнира IgG4, с SEQ ID NO: 4911. «Средний» эталонный спейсер представляет собой спейсер, полученный из шарнира IgG4, с SEQ ID NO:4912. «Длинный» эталонный спейсер представляет собой спейсер, полученный из шарнира IgG4, с SEQ ID NO: 4913. Все кинетические кривые уничтожения IncuCyte представляют сигнал NucLight Red с течением времени. Нетрансдуцированные первичные Т-клетки обозначены как «NTC» на этом и всех графических материалах.

[72] **Фиг. 15А-15Е.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную FMC63-CAR-T в присутствии клеток-мишеней Raji-NLR, экспрессирующих целевой антиген CD19 человека у донора D4869. На **Фиг. 15А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 15В** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 14А**. На **Фиг. 15С-15Е** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (**Фиг. 15С**), IL-2 (**Фиг. 15D**) и TNF α (**Фиг. 15Е**) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[73] **Фиг. 16А-16Е.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную FMC63-CAR-T, в присутствии клеток-мишеней Nalm6 (Nalm6-NLR), меченных NucLight Red, экспрессирующих целевой антиген CD19 человека у донора D3868. На **Фиг. 16А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 16В** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 14А**. На **Фиг. 16С-16Е** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (**Фиг. 16С**), IL-2 (**Фиг. 16D**) и TNF α (**Фиг. 16Е**) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[74] **Фиг. 17А-17Е.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную FMC63-CAR-T, в присутствии клетки-мишени Nalm6-NLR, экспрессирующей целевой антиген CD19 человека, у донора D4869. На **Фиг. 17А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 17В** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 14А**. На **Фиг. 17С-17Е** представлены гистограммы,

демонстрирующие концентрации IFN- γ (Фиг. 17C), IL-2 (Фиг. 17D) и TNF α (Фиг. 17E) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[75] **Фиг. 18A-18E.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную FMC63-CAR-T в присутствии клеток-мишеней Raji, меченных NucLight Red, с нокаутом CD19 (Raji_CD19_KO-NLR) у донора D3868. На **Фиг. 18A** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 18B** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 18A**. На **Фиг. 18C-18E** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (Фиг. 18C), IL-2 (Фиг. 18D) и TNF α (Фиг. 18E) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[76] **Фиг. 19A-19E.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную FMC63-CAR-T в присутствии клеток-мишеней Raji, меченных NucLight Red, с нокаутом CD19 (Raji_CD19_KO-NLR) у донора D4869. На **Фиг. 19A** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 19B** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 19A**. На **Фиг. 19C-19E** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (Фиг. 19C), IL-2 (Фиг. 19D) и TNF α (Фиг. 19E) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[77] **Фиг. 20A-20C.** Гистограммы, демонстрирующие профиль секреции цитокинов на FMC63-CAR-T-клетках, полученных от донора D3868, экспрессирующего указанные спейсеры, в отсутствие клеток-мишеней. Считается, что CAR-T со спейсерами, проявляющими повышенную продукцию цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, проявляют тонический сигналинг.

[78] **Фиг. 21A-21C.** Гистограммы, демонстрирующие профиль секреции цитокинов на FMC63-CAR-T-клетках, полученных от донора D4869, экспрессирующего указанные спейсеры, в отсутствие клеток-мишеней. Считается, что CAR-T со спейсерами, проявляющими повышенную продукцию цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, проявляют тонический сигналинг.

[79] **Фиг. 22A-22B.** Графики рассеяния, обобщающие зависимость от мишени секрецию цитокинов по сравнению с AUC уничтожения для FMC63-CAR-T-клеток (спейсеры указаны метками) при совместном культивировании с клетками Raji-NLR. На **Фиг. 22A** представлен донор D3868. На **Фиг. 22B** представлен донор D4869. Наиболее эффективные спейсеры находятся в верхней левой части графика (высокий уровень IFN- γ , высокий уровень IL-2 и низкая AUC).

[80] **Фиг. 23A-23D.** Диаграммы рассеивания, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на секрецию IL-2 и IFN γ FMC63-CAR-T-клетками после 24-часового совместного культивирования с клетками-мишенями, экспрессирующими человеческий CD19. Заштрихованные прямоугольники указывают приблизительный диапазон длин спейсеров, которое приводит к максимальной продукции цитокинов. На **Фиг. 23A**

показаны FMC63-CAR-T, полученные от донора D3868, которые совместно культивировали с клетками Raji. На **Фиг. 23B** показаны FMC63-CAR-T, полученные от донора D3868, которые совместно культивировали с клетками Nalm6. На **Фиг. 23C** показаны FMC63-CAR-T, полученные от донора D4869, которые совместно культивировали с клетками Raji. На **Фиг. 23D** показано, что FMC63-CAR-T, полученные от донора D4869, культивировали совместно с клетками Nalm6.

[81] **Фиг. 24A и 24B.** Графики рассеяния, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на AUC для уничтожения, когда клетки Raji, экспрессирующие человеческий CD19, совместно культивировали с FMC63-CAR-T-клетками, полученными от донора D3868 (**Фиг. 24A**) и донора D4869 (**Фиг. 24B**), соответственно. Названия спейсеров обозначены метками. Кружки представляют приблизительный диапазон длин спейсеров, которые приводят к самой быстрой кинетике уничтожения.

[82] **Фиг. 25A-25D.** Графики, обобщающие влияние указанных спейсеров на долгосрочную цитотоксическую активность FMC63-CAR-T-клеток после многократного воздействия клеток-мишеней, экспрессирующих человеческий CD19, от донора D3868. На **Фиг. 25A** показаны кривые уничтожения клеток-мишеней Nalm6-NLR во время четырех раундов совместного культивирования с FMC63-CAR-T-клетками, экспрессирующими CAR, содержащие указанные спейсеры. На **Фиг. 25B** выделена субпопуляция FMC63-CAR-T-клеток с наиболее стойкой долгосрочной цитотоксичностью при повторном воздействии клеток Nalm6. На **Фиг. 25C** показаны кривые уничтожения клеток-мишеней Raji-NLR во время четырех раундов совместного культивирования с FMC63-CAR-T-клетками, экспрессирующими CAR, содержащие указанные спейсеры. На **Фиг. 25D** выделена субпопуляция FMC63-CAR-T-клеток с наиболее стойкой долгосрочной цитотоксичностью при повторном воздействии клеток Raji.

[83] **Фиг. 26A-26D.** Графики, обобщающие влияние указанных спейсеров на долгосрочную цитотоксическую активность FMC63-CAR-T-клеток после многократного воздействия клеток-мишеней, экспрессирующих человеческий CD19, от донора D4869. На **Фиг. 26A** показаны кривые уничтожения клеток-мишеней Nalm6-NLR во время четырех раундов совместного культивирования с FMC63-CAR-T-клетками, экспрессирующими CAR, содержащие указанные спейсеры. На **Фиг. 26B** выделена субпопуляция FMC63-CAR-T-клеток с наиболее стойкой долгосрочной цитотоксичностью при повторном воздействии клеток Nalm6. На **Фиг. 26C** показаны кривые уничтожения клеток-мишеней Raji-NLR во время четырех раундов совместного культивирования с FMC63-CAR-T-клетками, экспрессирующими CAR, содержащие указанные спейсеры. На **Фиг. 26D** выделена субпопуляция FMC63-CAR-T-клеток с наиболее стойкой долгосрочной цитотоксичностью при повторном воздействии клеток Raji.

[84] **Фиг. 27A и 27B.** Процент трансдуцированных клеток, измеренный по поверхностной экспрессии маркера трансдукции EGFRt на живых первичных T-клетках у доноров D13814 (**Фиг. 27A**) и D15842 (**Фиг. 27B**).

[85] **Фиг. 27C и 27D.** СИФ для связанного белка L на живых трансдуцированных

клетках (**EGFR⁺** клетки) у донора D13814 (**Фиг. 27С**) и донора D15842 (**фиг. 27D**). Треугольники указывают на уменьшение длины спейсера в пределах данного типа иммуноглобулина.

[86] **Фиг. 28А-28Е**. Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную Т-клетками с CAR к Her2, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red (A549-NLR), экспрессирующих целевой антиген Her2 человека (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа) (с использованием Т-клеток от донора D13814). На **Фиг. 28А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 28В** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 28А**. На **Фиг. 28С-28Е** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (**Фиг. 28С**), IL-2 (**Фиг. 28D**) и TNF α (**Фиг. 28Е**) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[87] **Фиг. 29А-29Е**. Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную Т-клетками с CAR к Her2, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red (A549-NLR), экспрессирующих целевой антиген Her2 человека (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа) (с использованием Т-клеток от донора D15842). На **Фиг. 29А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 29В** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 29А**. На **Фиг. 29С-29Е** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (**Фиг. 29С**), IL-2 (**Фиг. 29D**) и TNF α (**Фиг. 29Е**) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[88] **Фиг. 30А-30Е**. Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную Т-клетками с CAR к Her2, в присутствии клеток-мишеней T47D, меченных NucLight Red (T47D-NLR), экспрессирующих целевой антиген Her2 человека (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа) (с использованием Т-клеток от донора D13814). На **Фиг. 30А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 30В** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 30А**. На **Фиг. 30С-30Е** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (**Фиг. 30С**), IL-2 (**Фиг. 30D**) и TNF α (**Фиг. 30Е**) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[89] **Фиг. 31А-31Е**. Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную Т-клетками с CAR к Her2, в присутствии клеток-мишеней T47D, меченных NucLight Red (T47D-NLR), экспрессирующих целевой антиген Her2 человека (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа) (с использованием Т-клеток от донора D15842). На **Фиг. 31А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 31В** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 31А**. На **Фиг. 31С-31Е**

представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (**Фиг. 31С**), IL-2 (**Фиг. 31D**) и TNF α (**Фиг. 31E**) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[90] **Фиг. 32А-32Е.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную Т-клетками с CAR к Her2, в присутствии клеток-мишеней T47D, меченных NucLight Red, с нокаутом Her2 (T47D_Her2_KO-NLR) (с использованием Т-клеток от донора D13814). На **Фиг. 32А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 32В** показана AUC, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 32А**. На **Фиг. 32С-32Е** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (**Фиг. 32С**), IL-2 (**Фиг. 32D**) и TNF α (**Фиг. 32Е**) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[91] **Фиг. 33А-33Е.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную Т-клетками с CAR к Her2, в присутствии клеток-мишеней T47D, меченных NucLight Red, с нокаутом Her2 (T47D_Her2_KO-NLR) (с использованием Т-клеток от донора D15842). На **Фиг. 33А** показаны кинетические кривые уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 33В** показана AU, рассчитанная для каждой кривой уничтожения на **Фиг. 33А**. На **Фиг. 33С-33Е** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN- γ (**Фиг. 33С**), IL-2 (**Фиг. 33D**) и TNF α (**Фиг. 33Е**) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[92] **Фиг. 34А-34С.** Гистограммы, показывающие профиль секреции цитокинов (IFN-гамма, **Фиг. 34А**; IL-2, **Фиг. 34В**; TNF-альфа, **Фиг. 34С**) Т-клетками с CAR к Her2 (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа), полученными от донора D13814, экспрессирующими указанные спейсеры в отсутствие клеток-мишеней. Считается, что CAR-Т со спейсерами, проявляющими повышенную продукцию цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, проявляют тонический сигналинг.

[93] **Фиг. 35А-35С.** Гистограммы, показывающие профиль секреции цитокинов (IFN-гамма, **Фиг. 35А**; IL-2, **Фиг. 35В**; TNF α , **Фиг. 35С**) Т-клетками с CAR к Her2, полученными от донора D15842, экспрессирующими указанные спейсеры в отсутствие клеток-мишеней. Считается, что CAR-Т со спейсерами, проявляющими повышенную продукцию цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, проявляют тонический сигналинг.

[94] **Фиг. 36А-36D.** Диаграммы рассеяния, обобщающие зависимость от мишени секрецию цитокинов по сравнению с AUC уничтожения для Т-клеток с CAR к Her2 (спейсеры указаны метками) при совместном культивировании с клетками-мишенями, экспрессирующими Her2 человека. **Фиг. 36А:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D13814, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 36В:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D13814, культивировали совместно с клетками T47D. **Фиг. 36С:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D15842, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 36D:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D15842,

культивировали совместно с клетками T47D. Наиболее эффективные спейсеры находятся в верхней левой части графика (высокий уровень IFN- γ , высокий уровень IL-2 и низкая AUC).

[95] **Фиг. 37A-37D.** Диаграммы рассеивания, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на секрецию IL-2 и IFN γ Т-клетками с CAR к Her2 после 24-часового совместного культивирования с клетками-мишенями, экспрессирующими человеческий Her2. Заштрихованные прямоугольники указывают приблизительный диапазон длин спейсеров, который приводит к максимальной продукции цитокинов. **Фиг. 37A:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D13814, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 37B:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D13814, культивировали совместно с клетками T47D. **Фиг. 37C:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D15842, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 37D:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D15842, культивировали совместно с клетками T47D.

[96] **Фиг. 38A-38D.** Диаграммы рассеивания, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на уничтожение AUC, когда клетки-мишени, экспрессирующие Her2 человека, совместно культивировали с Т-клетками с CAR к Her2. **Фиг. 38A:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D13814, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 38B:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D13814, культивировали совместно с клетками T47D. **Фиг. 38C:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D15842, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 38D:** Т-клетки с CAR к Her2, полученные от донора D15842, культивировали совместно с клетками T47D. Названия спейсеров обозначены метками. Кружки представляют приблизительный диапазон длин спейсеров, которые приводят к самой быстрой кинетике уничтожения.

[97] **Фиг. 39A-39D.** Графики, обобщающие эффекты указанных спейсеров на долгосрочную цитотоксическую активность Т-клеток с CAR к Her2 от донора D13814 после многократного воздействия клеток-мишеней, экспрессирующих Her2 человека. На **Фиг. 39A** показаны кривые уничтожения клеток-мишеней A549-NLR во время четырех раундов совместного культивирования с Т-клетками с CAR к Her2, экспрессирующими CAR, содержащие указанные спейсеры. На **Фиг. 39B** выделена субпопуляция Т-клеток с CAR к Her2 с наиболее стойкой долгосрочной цитотоксичностью при повторном воздействии клеток A549. На **Фиг. 39C** показаны кривые уничтожения клеток-мишеней T47D-NLR во время четырех раундов совместного культивирования с Т-клетками с CAR к Her2, экспрессирующими CAR, содержащие указанные спейсеры. На **Фиг. 39D** выделена субпопуляция Т-клеток с CAR к Her2 с наиболее стойкой долгосрочной цитотоксичностью при повторном воздействии клеток T47D.

[98] **Фиг. 40A-40D.** Графики, обобщающие эффекты указанных спейсеров на долгосрочную цитотоксическую активность Т-клеток с CAR к Her2 от донора D15842 после многократного воздействия клеток-мишеней, экспрессирующих Her2 человека. На **Фиг. 40A** показаны кривые уничтожения клеток-мишеней A549-NLR во время четырех раундов совместного культивирования с Т-клетками с CAR к Her2, экспрессирующими

CAR, содержащие указанные спейсеры. На **Фиг. 40В** выделена субпопуляция Т-клеток с CAR к Her2 с наиболее стойкой долгосрочной цитотоксичностью при повторном воздействии клеток A549. На **Фиг. 40С** показаны кривые уничтожения клеток-мишеней T47D-NLR во время четырех раундов совместного культивирования с Т-клетками с CAR к Her2, экспрессирующими CAR, содержащие указанные спейсеры. На **Фиг. 40D** выделена субпопуляция Т-клеток с CAR к Her2 с наиболее стойкой долгосрочной цитотоксичностью при повторном воздействии клеток T47D.

[99] **Фиг. 41.** Трехмерная структура укладки Ig (A) и топология структурных элементов в складке (B). Показано расположение элементов вторичной структуры β -цепей и расположение петлевых областей, соединяющих β -цепи. Как описано ниже, каждая петлевая область или ее фрагмент (необязательно содержащий одну или более аминокислот из смежной β -цепи) из константного домена иммуноглобулина (например, константного домена CH1, CH2, CH3 или CL) из иммуноглобулина человека или мыши можно использовать в качестве спейсера CAR по настоящему изобретению.

[100] **Фиг. 42.** Множественное выравнивание последовательностей тяжелых цепей иммуноглобулина, демонстрирующее вторичную структуру (конформацию), наложенную на выравнивание последовательностей. Как описано в описании, подпоследовательности, имеющие спиральную вторичную структуру или обогащенные аминокислотными остатками, имеющие спиральную вторичную структуру, могут быть использованы в качестве спейсеров CAR по настоящему изобретению. Области с высокими концентрациями пролина, цистеина и глицина выделены.

[101] **Фиг. 43.** Множественное выравнивание последовательностей легких цепей иммуноглобулина, демонстрирующее вторичную структуру (конформацию), наложенную на выравнивание последовательностей. Как описано в описании, подпоследовательности, имеющие спиральную вторичную структуру или обогащенные аминокислотными остатками, имеющие спиральную вторичную структуру, могут быть использованы в качестве спейсеров CAR по настоящему изобретению.

[102] **Фиг. 44А и 44В.** Процент трансдуцированных клеток, измеренный по поверхностной экспрессии маркера трансдукции EGFRt на живых первичных Т-клетках у донора D7811 (**Фиг. 44А**) и донора D5018 (**Фиг. 44В**). На **Фиг. 44С и 44D** показана СИФ для связанного hROR1-Fc на живых трансдуцированных клетках (EGFRt+ клетки) у донора D7811 (**Фиг. 44С**) и донора D5018 (**Фиг. 44D**).

[103] **Фиг. 45А-45С.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R11-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red (A549-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D7811. На **Фиг. 45А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. Спейсеры, для которых не были получены функциональные данные *in vitro*, обозначены как «Н/О» (не определено) на этой фигуре и фигурах ниже. На **Фиг. 45В-С** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN-гамма (B) и IL-2 (C) в средах для совместного культивирования через

24 часа после совместного культивирования. Незаштрихованные столбцы указывают на измерения, выходящие за пределы линейного динамического диапазона анализа, поэтому их не следует интерпретировать количественно.

[104] **Фиг. 46А-46С.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R11-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red (A549-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D5018. На **Фиг. 46А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 46В-С** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма (В) и IL-2 (С) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Незаштрихованные столбцы указывают на измерения, выходящие за пределы линейного динамического диапазона анализа, поэтому их не следует интерпретировать количественно.

[105] **Фиг. 47А-47С.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R11-CAR, в присутствии клеток-мишеней H1975, меченных NucLight Red (H1975-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D7811. На **Фиг. 47А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 47В-С** представлены гистограммы, демонстрирующие концентрации IFN-гамма (В) и IL-2 (С) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Незаштрихованные столбцы указывают на измерения, выходящие за пределы линейного динамического диапазона анализа, поэтому их не следует интерпретировать количественно.

[106] **Фиг. 48А-48В.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R11-CAR, в присутствии клеток-мишеней H1975, меченных NucLight Red (H1975-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D5018. На **Фиг. 48А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 48В** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[107] **Фиг. 49А-49В.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R11-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red, с нокаутом ROR1 (A549_ROR1_KO-NLR) у донора D7811. На **Фиг. 49А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 49В** представлена гистограмма, показывающая концентрации IFN-гамма в среде для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Небольшая популяция ROR1+ клеток присутствует в линии клеток A549_ROR1_KO-NLR, что объясняет очевидное уничтожение (А) и продукцию цитокинов (В) в этом анализе.

[108] **Фиг. 50А-50В.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность,

индуцированную R11-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red, с нокаутом ROR1 (A549_ROR1_KO-NLR) у донора D5018. На **Фиг. 50А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 50В** представлена гистограмма, показывающая концентрации IFN-гамма в среде для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Небольшая популяция ROR1+ клеток присутствует в линии клеток A549_ROR1_KO-NLR, что объясняет очевидное уничтожение (А) и продукцию цитокинов (В) в этом анализе.

[109] **Фиг. 51.** Гистограмма, демонстрирующая профиль секреции цитокинов на R11-CAR-Т-клетках, полученных от донора D7811, экспрессирующего CAR, имеющие указанные спейсеры, в отсутствие клеток-мишеней. Отсутствие спейсера приводило к повышенной продукции цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, что можно было бы рассматривать как тонический сигналинг.

[110] **Фиг. 52.** Гистограмма, демонстрирующая профиль секреции цитокинов на R11-CAR-Т-клетках, полученных от донора D5018, экспрессирующего CAR, имеющие указанные спейсеры, в отсутствие клеток-мишеней. Отсутствие спейсера приводило к повышенной продукции цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, что можно было бы рассматривать как тонический сигналинг.

[111] **Фиг. 53А-53В.** Диаграммы рассеивания, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на зависимость от мишени секрецию цитокинов (размер точки IFN-гамма) и AUC уничтожения для R11-CAR-Т-клеток при совместном культивировании с человеческими клетками-мишенями, экспрессирующими ROR1. **Фиг. 53А:** R11-CAR-Т, полученные от донора D7811, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 53В:** R11-CAR-Т, полученные от донора D7811, культивировали совместно с клетками H1975.

[112] **Фиг. 54А-54В.** Диаграммы рассеивания, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на зависимость от мишени секрецию цитокинов (размер точки IFN-гамма) и AUC уничтожения для R11-CAR-Т-клеток при совместном культивировании с клетками-мишенями. **Фиг. 54А:** R11-CAR-Т, полученные от донора D5018, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 54В:** R11-CAR-Т, полученные от донора D5018, культивировали совместно с клетками H1975.

[113] **Фиг. 55А и 55В.** Процент трансдуцированных клеток, измеренный по поверхностной экспрессии маркера трансдукции EGFRt на живых первичных Т-клетках у донора D2735 (**Фиг. 55А**) и донора D5018 (**Фиг. 55В**).

[114] **Фиг. 55С и 55D.** СИФ для связанного hROR1-Fc на живых трансдуцированных клетках (EGFRt+ клетки) у донора D2735 (**Фиг. 55С**) и донора D5018 (**Фиг. 55D**).

[115] **Фиг. 56А-56С.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R12-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red (A549-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D2735. На **Фиг. 56А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для

каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 56В** и **56С** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма (В) и IL-2 (С) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Незаштрихованные столбцы указывают на измерения, выходящие за пределы линейного динамического диапазона анализа, поэтому их не следует интерпретировать количественно.

[116] **Фиг. 57А-57С.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R12-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red (A549-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D5018. На **Фиг. 57А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 57В** и **57С** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма (В) и IL-2 (С) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[117] **Фиг. 58А-58С.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R12-CAR, в присутствии клеток-мишеней H1975, меченных NucLight Red (H1975-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D2735. На **Фиг. 58А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 58В** и **58С** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма (В) и IL-2 (С) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Незаштрихованные столбцы указывают на измерения, выходящие за пределы линейного динамического диапазона анализа, поэтому их не следует интерпретировать количественно.

[118] **Фиг. 59А-59С.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R12-CAR, в присутствии клеток-мишеней H1975, меченных NucLight Red (H1975-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D5018. На **Фиг. 59А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 59В** и **59С** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма (В) и IL-2 (С) в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[119] **Фиг. 60А-60В.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную R12-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red, с нокаутом ROR1 (A549_ROR1_KO-NLR) у донора D2735. На **Фиг. 60А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 60В** представлена гистограмма, показывающая концентрации IFN-гамма в среде для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Небольшая популяция ROR1+ клеток присутствует в линии клеток A549_ROR1_KO-NLR, что объясняет очевидное уничтожение (А) и продукцию цитокинов (В) в этом анализе.

[120] **Фиг. 61А-61В.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность,

индуцированную R12-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red, с нокаутом ROR1 (A549_ROR1_KO-NLR) у донора D5018. На **Фиг. 61А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 61В** представлена гистограмма, показывающая концентрации IFN-гамма в среде для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Небольшая популяция ROR1+ клеток присутствует в линии клеток A549_ROR1_KO-NLR, что объясняет очевидное уничтожение (А) и продукцию цитокинов (В) в этом анализе.

[121] **Фиг. 62.** Гистограмма, демонстрирующая профиль секреции цитокинов на R12-CAR-Т-клетках, полученных от донора D2735, экспрессирующего CAR, имеющие указанные спейсеры, в отсутствие клеток-мишеней. Отсутствие спейсера приводило к повышенной продукции цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, что можно было бы рассматривать как тонический сигналинг.

[122] **Фиг. 63.** Гистограмма, демонстрирующая профиль секреции цитокинов на R12-CAR-Т-клетках, полученных от донора D5018, экспрессирующего CAR, имеющие указанные спейсеры, в отсутствие клеток-мишеней. Отсутствие спейсера приводило к повышенной продукции цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, что можно было бы рассматривать как тонический сигналинг.

[123] **Фиг. 64А-64В.** Диаграммы рассеивания, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на зависимость от мишени секрецию цитокинов (размер точки IFN-гамма) и AUC уничтожения для R12-CAR-Т-клеток при совместном культивировании с человеческими клетками-мишенями, экспрессирующими ROR1. **Фиг. 64А:** R12-CAR-Т, полученные от донора D2735, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 64В:** R12-CAR-Т, полученные от донора D2735, культивировали совместно с клетками H1975.

[124] **Фиг. 65А-65В.** Диаграммы рассеивания, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на зависимость от мишени секрецию цитокинов (размер точки IFN-гамма) и AUC уничтожения для R12-CAR-Т-клеток при совместном культивировании с клетками-мишенями. **Фиг. 65А:** R12-CAR-Т, полученные от донора D5018, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 65В:** R12-CAR-Т, полученные от донора D5018, культивировали совместно с клетками H1975.

[125] **Фиг. 66А и 66В.** Процент трансдуцированных клеток, измеренный по поверхностной экспрессии маркера трансдукции EGFRt на живых первичных Т-клетках у донора D2089 (**Фиг. 66А**) и донора D5018 (**Фиг. 66В**).

[126] На **Фиг. 66С и 66D** показана СИФ для связанного hROR1-Fc на живых трансдуцированных клетках (EGFRt+ клетки) у донора D2089 (**Фиг. 66С**) и донора D5018 (**Фиг. 66D**).

[127] **Фиг. 67А-67В.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную 2A2-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red (A549-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D2089. На **Фиг. 67А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для

каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 67B** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[128] На **Фиг. 68A-68B** обобщено влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную 2A2-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red (A549-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D5018. На **Фиг. 68A** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 68B** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования.

[129] На **Фиг. 69A-69B** обобщено влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную 2A2-CAR, в присутствии клеток-мишеней H1975, меченных NucLight Red (H1975-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D2089. На **Фиг. 69A** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 69B** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Незаштрихованные столбцы указывают на измерения, выходящие за пределы линейного динамического диапазона анализа, поэтому их не следует интерпретировать количественно.

[130] На **Фиг. 70A-70B** обобщено влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную 2A2-CAR, в присутствии клеток-мишеней H1975, меченных NucLight Red (H1975-NLR), экспрессирующих целевой антиген ROR1 человека у донора D5018. На **Фиг. 70A** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 70B** представлены гистограммы, показывающие концентрации IFN-гамма в средах для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Незаштрихованные столбцы указывают на измерения, выходящие за пределы линейного динамического диапазона анализа, поэтому их не следует интерпретировать количественно.

[131] **Фиг. 71A-71B.** Влияние указанных спейсеров на цитотоксичность, индуцированную 2A2-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red, с нокаутом ROR1 (A549_ROR1_KO-NLR) у донора D2089. На **Фиг. 71A** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. На **Фиг. 71B** представлена гистограмма, показывающая концентрации IFN-гамма в среде для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Небольшая популяция ROR1+ клеток присутствует в линии клеток A549_ROR1_KO-NLR, что объясняет очевидное уничтожение (A) и продукцию цитокинов (B) в этом анализе.

[132] На **Фиг. 72A-72B** обобщено влияние указанных спейсеров на

цитотоксичность, индуцированную 2A2-CAR, в присутствии клеток-мишеней A549, меченных NucLight Red, с нокаутом ROR1 (A549_ROR1_KO-NLR) у донора D5018. **На Фиг. 72А** показана AUC, рассчитанная для кинетических кривых уничтожения IncuCyte для каждого варианта CAR с указанным спейсером. **На Фиг. 72В** представлена гистограмма, показывающая концентрации IFN-гамма в среде для совместного культивирования через 24 часа после совместного культивирования. Небольшая популяция ROR1+ клеток присутствует в линии клеток A549_ROR1_KO-NLR, что объясняет очевидное уничтожение (А) и продукцию цитокинов (В) в этом анализе.

[133] **Фиг. 73.** Гистограмма, демонстрирующая профиль секреции цитокинов на 2A2-CAR-T-клетках, полученных от донора D2089, экспрессирующего CAR, имеющие указанные спейсеры, в отсутствие клеток-мишеней. Отсутствие спейсера приводило к повышенной продукции цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, что можно было бы рассматривать как тонический сигналинг.

[134] **Фиг. 74.** Гистограмма, демонстрирующая профиль секреции цитокинов на 2A2-CAR-T-клетках, полученных от донора D5018, экспрессирующего CAR, имеющие указанные спейсеры, в отсутствие клеток-мишеней. Отсутствие спейсера приводило к повышенной продукции цитокинов в отсутствие клеток-мишеней, что можно было бы рассматривать как тонический сигналинг.

[135] **Фиг. 75А-75В.** Диаграммы рассеивания, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на зависимость от мишени секрецию цитокинов (размер точки IFN-гамма) и AUC уничтожения для 2A2-CAR-T-клеток при совместном культивировании с человеческими клетками-мишенями, экспрессирующими ROR1. **Фиг. 75А:** 2A2-CAR-T, полученные от донора D2089, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 75В:** 2A2-CAR-T, полученные от донора D2089, культивировали совместно с клетками H1975.

[136] **Фиг. 76А-76В.** Диаграммы рассеивания, обобщающие влияние указанных длин спейсеров на зависимость от мишени секрецию цитокинов (размер точки IFN-гамма) и AUC уничтожения для 2A2-CAR-T-клеток при совместном культивировании с клетками-мишенями. **Фиг. 76А:** 2A2-CAR-T, полученные от донора D5018, культивировали совместно с клетками A549. **Фиг. 76В:** 2A2-CAR-T, полученные от донора D5018, культивировали совместно с клетками H1975.

[137] **Фиг. 77А-77Е.** Диаграммы рассеивания, обобщающие дифференциальные эффекты указанных длин спейсеров на зависимость от мишени секрецию цитокинов (размер точки IFN-гамма) и AUC уничтожения для Т-клеток с CAR FMC63, Her, R11, R12 и 2A2 при совместном культивировании с клетками-мишенями, экспрессирующими CAR человека. Графики рассеяния демонстрируют оптимальную длину спейсера для CAR R12 (**Фиг. 77А**), 2A2 (**Фиг. 77В**), FMC63 (**Фиг. 77С**), Her (**Фиг. 77D**) и R11 (**Фиг. 77Е**).

[138] **Фиг. 78А.** Рост опухоли в зависимости от времени у мышей, получавших 2000000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер.

[139] **Фиг. 78В.** Изменение массы тела в зависимости от времени у мышей, получавших 2000000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-

спейсер.

[140] **Фиг. 79А.** Рост опухоли в зависимости от времени у мышей, получавших 500000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер.

[141] **Фиг. 79В.** Изменение массы тела в зависимости от времени у мышей, получавших 500000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер.

[142] **Фиг. 80.** Процент выживаемости в зависимости от времени у мышей, получавших 2000000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер.

[143] **Фиг. 81.** Процент выживаемости в зависимости от времени у мышей, получавших 500000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер.

[144] **Фиг. 82.** Количество CD3⁺ клеток на мл крови на 1-й день после введения дозы Т-клеток. Высокая доза представляет собой 2000000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер. Низкая доза представляет собой 500000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер.

[145] **Фиг. 83.** Количество CD3⁺ EGFR⁺ клеток (т. е. CAR-Т-клеток) на мл крови в день 1 после введения дозы Т-клеток. Высокая доза представляет собой 2000000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер. Низкая доза представляет собой 500000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер.

[146] **Фиг. 84А-84L.** Количество Т-клеток на мл крови в зависимости от времени у мышей, получавших 2000000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер. На **Фиг. 84А** показана ФК для CD3⁺ клеток (все Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84В** показана ФК для CD3⁺ EGFR⁺ клеток (все CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84С** показана ФК для CD3⁺ CAR⁺ клеток (все CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84D** показана ФК для CD8⁺ клеток (все CD8⁺ Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84Е** показана ФК для CD8⁺ EGFR⁺ клеток (CD8⁺ CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84F** показана ФК для CD8⁺ CAR⁺ клеток (CD8⁺ CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84G** показана ФК для CD8⁺ CD4⁺ клеток (все CD8⁺ CD4⁺ Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84H** показана ФК для CD8⁺ CD4⁺ EGFR⁺ клеток (CD8⁺ CD4⁺ CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84I** показана ФК для CD8⁺ CD4⁺ CAR⁺ клеток (CD8⁺ CD4⁺ CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84J** показана ФК для CD4⁺ клеток (все CD4⁺ Т-клетки) в крови, на **Фиг. 84K** показана ФК для CD4⁺ EGFR⁺ клеток (CD4⁺ CAR-Т-клетки) в крови, и на **Фиг. 84L** показана ФК для CD4⁺ CAR⁺ клеток (CD4⁺ CAR-Т-клетки) в крови.

[147] **Фиг. 85А-85L.** Количество Т-клеток на мл крови в зависимости от времени у мышей, получавших 500000 CAR-положительных Т-клеток с указанной конструкцией R12-спейсер. На **Фиг. 85А** показана ФК для CD3⁺ клеток (все Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85В** показана ФК для CD3⁺ EGFR⁺ клеток (все CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85С** показана ФК для CD3⁺ CAR⁺ клеток (все CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85D** показана

ФК для CD8⁺ клеток (все CD8⁺ Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85E** показана ФК для CD8⁺ EGFR⁺ клеток (CD8⁺ CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85F** показана ФК для CD8⁺ CAR⁺ клеток (CD8⁺ CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85G** показана ФК для CD8⁺ CD4⁺ клеток (все CD8⁺ CD4⁺ Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85H** показана ФК для CD8⁺ CD4⁺ EGFR⁺ клеток (CD8⁺ CD4⁺ CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85I** показана ФК для CD8⁺ CD4⁺ CAR⁺ клеток (CD8⁺ CD4⁺ CAR-Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85J** показана ФК для CD4⁺ клеток (все CD4⁺ Т-клетки) в крови, на **Фиг. 85K** показана ФК для CD4⁺ EGFR⁺ клеток (CD4⁺ CAR-Т-клетки) в крови, и на **Фиг. 85L** показана ФК для CD4⁺ CAR⁺ клеток (CD4⁺ CAR-Т-клетки) в крови.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[148] Настоящее изобретение направлено на CAR, содержащие спейсеры, полученные из последовательностей шарнирных и/или константных областей иммуноглобулина (Ig), полинуклеотиды, кодирующие такие CAR, клетки, экспрессирующие CAR, и способы их применения. В настоящем изобретении представлены неограничивающие примеры различных аспектов. В некоторых аспектах спейсеры CAR по настоящему изобретению представляют собой фрагменты шарнирных и/или константных областей IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE или IgM. В некоторых аспектах спейсер CAR содержит подпоследовательность из шарнира IgM и/или константной области, а также содержит короткую концевую последовательность, полученную из другой(-их) области(-ей), например, спейсер CAR может содержать подпоследовательность шарнира и подпоследовательность CH1 и/или CH2. В некоторых аспектах спейсер CAR может содержать последовательность, соединяющую две константные области.

[149] В некоторых аспектах спейсеры CAR, полученные из константных областей (например, константных областей тяжелой цепи и/или константных областей легкой цепи), соответствуют неструктурированным последовательностям с высоким содержанием пролина, цистеина, глицина или их комбинаций и, как правило, соответствуют доступным для растворителя петлям. См., например, Фиг. 41 и 42. Например, спейсер 15 соответствует N-концевому участку гибкой петли, соединяющей β -цепь А и β -цепь В области CH2 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Соответственно, в некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из неструктурированной гибкой петли, соединяющей элементы вторичной структуры (например, α -спирали, β -цепи или их комбинации) в человеческом иммуноглобулине IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE или IgM, или фрагмента такой петли. В некоторых аспектах последовательность петли получена из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Расположение последовательностей петель, подходящих для использования в качестве спейсеров CAR по настоящему изобретению, может быть идентифицировано специалистом в данной области техники, например, посредством структурного присвоения аминокислотных остатков в файле PDB с использованием такой программы, как DSSP, P-SEA, DEFINE_S, SSTRUC, STRIDE,

PROSS, или PALSSE. В некоторых аспектах последовательность, подходящая в качестве спейсера CAR по настоящему изобретению, представляет собой последовательность петли домена иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 остатков пролина. В некоторых аспектах последовательность, подходящая в качестве спейсера CAR по настоящему изобретению, представляет собой последовательность петли домена иммуноглобулина, в которой по меньшей мере около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80% или около 90% аминокислотных остатков составляют пролин, цистеин, глицин или их комбинации.

[150] В некоторых аспектах спейсеры CAR по настоящему изобретению конструктивно разработано на основе, например, измерения расстояния между эпитопом, на который нацелен CAR-связывающий фрагмент, и поверхностью плазматической мембраны клетки-мишени, и/или межмембранного расстояния в сигнальном синапсе. В некоторых аспектах спейсеры CAR по настоящему изобретению представляют собой модульные последовательности, содержащие по меньшей мере одну полипептидную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE или IgM.

[151] Прежде чем настоящее изобретение будет описано более подробно, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными композициями или стадиями процессов, поскольку таковые, конечно, могут варьироваться. Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения этого описания, каждый из отдельных аспектов, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет дискретные компоненты и особенности, которые могут быть легко отделены или объединены с особенностями любого из нескольких других аспектов без отклонения от объема или сущности настоящего изобретения. Любой изложенный способ может выполняться в порядке перечисления событий или в любом другом логически возможном порядке.

[152] Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов данного изобретения, которые могут быть определены со ссылкой на описание в целом. Следует также понимать, что терминология, используемая в данном документе, применяется только для описания конкретных аспектов и не имеет ограничительного характера, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[153] Соответственно, термины, определенные ниже, определены в более полном объеме со ссылкой на это описание в целом.

I. Термины

[154] Для того, чтобы настоящее описание было более понятным, сначала определены некоторые термины. Если иное прямо не предусмотрено в данном документе, каждый из следующих терминов имеет значение, указанное ниже. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

[155] Следует отметить, что термины в форме единственного числа включают

ссылки на одно или несколько; например, «нуклеотидная последовательность» означает одну или несколько нуклеотидных последовательностей. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Следует также отметить, что в формулу настоящего изобретения могут вноситься правки с целью исключения любых необязательных элементов. Следовательно, данное утверждение должно служить в качестве предварительного основания для использования такой исчерпывающей терминологии, как «исключительно», «только» и т. п. в связи с указанием элементов формулы изобретения, или использования отрицательного ограничения.

[156] Кроме того, использование в данном документе союзов «и/или» следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», предназначен для включения фраз «А и В», «А или В»; «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или» в контексте такой фразы, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[157] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», в ином способе также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

[158] Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в словарях Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, для специалистов в данной области техники представлено общее пояснение многих терминов, использованных в раскрытии этого изобретения.

[159] Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. При приведении диапазона значений следует понимать, что каждое промежуточное целочисленное значение и каждая его часть между указанными верхним и нижним пределами этого диапазона также конкретно раскрывается вместе с каждым поддиапазоном между такими значениями. Верхний и нижний пределы любого диапазона могут независимо включаться в этот диапазон или исключаться из него, и каждый диапазон, в который включены любой из пределов, ни один из пределов либо оба предела, также охватывается настоящим изобретением. Таким образом, считается, что диапазоны, указанные в данном документе, являются сокращением для всех значений в пределах диапазона, включая указанные конечные точки. Например, под диапазоном «от 1

до 10» понимается любое число, комбинация чисел или поддиапазон из группы, состоящей из чисел 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

[160] Если значение указано явно, следует понимать, что значения, которые имеют приблизительно такое же количество или количество, как и указанное значение, также находятся в пределах объема настоящего изобретения. При раскрытии комбинации каждая подкомбинация элементов этой комбинации также конкретно раскрывается и находится в пределах объема настоящего изобретения. И наоборот, если по отдельности раскрываются различные элементы или группы элементов, также раскрываются их комбинации. Если любой элемент настоящего изобретения раскрывается как имеющий множество альтернатив, также в данном документе раскрываются примеры настоящего изобретения, в которых каждая альтернатива исключена по отдельности или в любой комбинации с другими альтернативами; более чем один элемент настоящего изобретения может иметь такие исключения, и тем самым раскрываются все комбинации элементов, имеющих такие исключения.

[161] Нуклеотиды обозначаются их общепринятыми однобуквенными кодами. Если не указано иное, нуклеотидные последовательности записывают слева направо в направлении от 5' к 3'. Нуклеотиды обозначаются в данном документе их общеизвестными однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Соответственно, «а» представляет собой аденин, «с» представляет собой цитозин, «g» представляет собой гуанин, «t» представляет собой тимин, а «u» представляет собой урацил.

[162] Аминокислотные последовательности записывают слева направо в направлении от amino-конца к карбокси-концу. Аминокислоты обозначаются в данном документе либо своими обычно известными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

[163] В контексте данного документа термин «около» применяется для обозначения приблизительно, примерно, около или в области. Если термин «около» используется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «около» может изменить числовое значение выше и ниже указанного значение с отклонением, *например*, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[164] Термины «введение», «процесс введения» и их грамматические варианты относятся к введению композиции по настоящему изобретению (например, полинуклеотида, кодирующего CAR, или клетки, экспрессирующей CAR), субъекту фармацевтически приемлемым путем. Введение композиции по настоящему изобретению (например, полинуклеотида, кодирующего CAR, или клетки, экспрессирующей CAR) субъекту осуществляется любым подходящим путем, включая внутривенный, пероральный, легочный, интраназальный, парентеральный (внутривенный, внутриаартериальный внутримышечный, внутривентриальный или подкожный), ректальный,

внутрилимфатический, интратекальный, периокулярный или местный путь.

[165] Введение включает самовведение и введение другим лицом. Подходящий путь введения позволяет композиции или агенту выполнять свою предполагаемую функцию. Например, если подходящим путем является внутривенный, композицию вводят путем введения композиции или агента в вену субъекта.

[166] Термин «аминокислотная замена» относится к замене аминокислотного остатка, присутствующего в исходной или эталонной последовательности (*например* последовательности дикого типа), другим аминокислотным остатком. Аминокислота может быть заменена в исходной или эталонной последовательности (*например*, в последовательности полипептида дикого типа), например, с помощью химического пептидного синтеза или рекомбинантных способов, известных в данной области техники. Соответственно, ссылка на «замену в положении X» относится к замене аминокислоты, присутствующей в положении X, альтернативным аминокислотным остатком. Паттерны замен могут быть описаны в соответствии со схемой AnY, где A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислоте, естественно или первоначально присутствующей в положении n, а Y представляет собой замещающий аминокислотный остаток. В других аспектах паттерны замещения могут быть описаны в соответствии со схемой An(YZ), при этом A представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислотному остатку, заменяющему аминокислоту, естественно или первоначально присутствующую в положении n, и Y и Z представляют собой альтернативные замещающие аминокислотные остатки, которые могут заменить A.

[167] В контексте данного документа термин «примерно» применительно к одному или более значениям, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично указанному эталонному значению. Термин «около» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше или меньше) от указанного эталонного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% от возможного значения).

[168] В контексте данного документа термин «консервативный» относится к нуклеотидам или аминокислотным остаткам полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности, соответственно, которые встречаются неизменными в одном и том же положении двух или более сравниваемых последовательностей. Нуклеотиды или аминокислоты, которые являются сравнительно консервативными, представляют собой такие, которые консервативны в наиболее родственных последовательностях по сравнению с нуклеотидами или аминокислотами, встречающимися в других местах в последовательности.

[169] В некоторых аспектах две или более последовательности являются «полностью консервативными» или «идентичными», если они на 100% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательности называются «высококонсервативными», если они идентичны друг другу на по меньшей мере около

70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95%. В некоторых аспектах две или более последовательностей называются «высококонсервативными», если они идентичны друг другу на около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 98% или около 99%. В некоторых аспектах две или более последовательностей считаются «консервативными», если они идентичны друг другу на по меньшей мере около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90% или около 95%. В некоторых аспектах две или более последовательностей называются «консервативными», если они идентичны друг другу на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 98% или около 99%. Консервативность последовательности может применяться ко всей длине полинуклеотида или полипептида или может применяться к их части, области или характеристике.

[170] В контексте данного документа термин «происходит из» указывает на взаимосвязь (например, структурное сходство) между первой и второй молекулами. Например, в случае спейсера CAR по настоящему изобретению, содержащего аминокислотную последовательность, полученную из последовательности иммуноглобулина человека (например, последовательность шарнирной и/или константной области), последовательность, полученная из последовательности иммуноглобулина человека (например, последовательность шарнирной и/или константной области) может содержать или состоять из полного шарнира, фрагмента шарнира, полного шарнира или фрагмента шарнира с дополнительными остатками, примыкающими к шарниру в иммуноглобулине дикого типа (например, одна или более аминокислот из константного домена, такого как домен СН1 или СН2), или может содержать или состоять из полной последовательности петлевой области, фрагмента петлевой области или фрагмента петлевой области с дополнительными остатками, примыкающими к петле в иммуноглобулине дикого типа (например, одна или более аминокислот из элемента вторичной структуры, например, β -листа, примыкающего к области петли в домене СН1, СН2 или СН3). В некоторых аспектах спейсер, полученный из константного домена, может быть получен из константного домена легкой цепи (CL).

[171] В контексте данного документа термин «петлевая область» относится к первичной последовательности аминокислотных остатков, которая соединяет две области, содержащие вторичную структуру, такую как α -спираль или β -лист, в непосредственном N-концевом и C-концевом направлениях первичной структуры из петлевой области. Примеры петлевых областей включают, но не ограничиваются ими, петлевые области СН2 или СН3. Складка иммуноглобулина представляет собой 2-слойный сэндвич из 7-9 антипараллельных β -цепей, расположенных в двух β -листах с топологией «греческого» ключа. См. Фиг. 41. Соответственно, спейсеры CAR, полученные из константного домена, по настоящему изобретению могут содержать, состоять или по существу состоять из

последовательности петли (или ее фрагмента), соединяющей β -лист А и β -лист В, β -лист В и β -лист С, β -лист С и β -лист С', β -лист С' и β -лист С'', β -лист С'' и β -лист D, β -лист D и β -лист E, β -лист E и β -лист F, или β -лист F и β -лист G в домене иммуноглобулина, например, константном домене иммуноглобулина (например, CH1, CH2, CH3 или CL).

[172] Спейсеры CAR, полученные из иммуноглобулина Ig человека (например, последовательность шарнирной и/или константной области), описанные в данном документе, также охватывают последовательности, полученные путем ковалентного связывания посредством пептидных связей последовательности, полученной из шарнирной области, как описано выше, т.е. спейсер может представлять собой полимер, содержащий множество повторов полного шарнира, его фрагментов или их комбинаций.

[173] В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, полученная из второй последовательности нуклеиновой кислоты, может включать нуклеотидную последовательность, идентичную или по существу аналогичную нуклеотидной последовательности второй последовательности нуклеиновой кислоты. В случае нуклеотидов или полипептидов производные соединения могут быть получены, например, с помощью природного мутагенеза, искусственного направленного мутагенеза или искусственного случайного мутагенеза. Мутагенез, используемый для получения нуклеотидов или полипептидов, может быть преднамеренно направленным или преднамеренно случайным, или их смесью. Мутагенез нуклеотида или полипептида для создания другого нуклеотида или полипептида, полученного из первого, может быть случайным событием (например, вызванным ошибочностью полимеразы), и идентификация полученного нуклеотида или полипептида может быть осуществлена с помощью соответствующих методов скрининга, например, как обсуждается в данном документе. Мутагенез полипептида обычно подразумевает манипуляции с полинуклеотидом, который кодирует полипептид.

[174] В некоторых аспектах нуклеотидная или аминокислотная последовательность, полученная из второй нуклеотидной или аминокислотной последовательности, имеет идентичность последовательности на по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 51%, по меньшей мере около 52%, по меньшей мере около 53%, по меньшей мере около 54%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 56%, по меньшей мере около 57%, по меньшей мере около 58%, по меньшей мере около 59%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 61%, по меньшей мере около 62%, по меньшей мере около 63%, по меньшей мере около 64%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 66%, по меньшей мере около 67%, по меньшей мере около 68%, по меньшей мере около 69%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 71%, по меньшей мере около 72%, по меньшей мере около 73%, по меньшей мере около 74%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около

86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% со второй нуклеотидной или аминокислотной последовательностью, соответственно, где первая нуклеотидная или аминокислотная последовательность сохраняет биологическую активность второй нуклеотидной или аминокислотной последовательности.

[175] Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к двум или более олигомерам (т.е. каждый из которых содержит последовательность азотистых оснований) или между олигомером и геном-мишенью, которые связаны друг с другом согласно правилам спаривания оснований по Уотсону-Крику. Например, последовательность азотистых оснований «Т-G-A (5' □ 3')» комплементарна последовательности азотистых оснований «А-С-T (3' □ 5')». Комплементарность может быть «частичной», когда менее чем все азотистые основания данной последовательности азотистых оснований соответствуют другой последовательности азотистых оснований в соответствии с правилами спаривания оснований. Например, в некоторых аспектах комплементарность между данной последовательностью азотистых оснований и другой последовательностью азотистых оснований может составлять около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90% или около 95%. Или может существовать «полная» или «идеальная» (100%) комплементарность между данной последовательностью азотистых оснований и другой последовательностью азотистых оснований, если говорить более подробно. Степень комплементарности между последовательностями азотистых оснований оказывает значительное влияние на эффективность и силу гибридизации между последовательностями.

[176] Термин «расположенная по ходу транскрипции» относится к нуклеотидной последовательности, расположенной на 3'-конце относительно эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых аспектах расположенные по ходу транскрипции нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые следуют за начальной точкой транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен по ходу транскрипции относительно сайта начала транскрипции. Термин «расположенная против хода транскрипции» относится к нуклеотидной последовательности, расположенной на 5'-конце относительно эталонной нуклеотидной последовательности.

[177] В контексте данного документа термины «антигенсвязывающий домен» и «антитело» охватывают иммуноглобулин, природный или частично или полностью синтетически полученный, и его антигенсвязывающие части. Термин также охватывает любой белок, имеющий домен связывания, гомологичный домену связывания иммуноглобулина. «Антигенсвязывающий домен» и «антитело» дополнительно включают полипептид, содержащий каркасную область гена иммуноглобулина или его части,

которая специфически связывает и распознает антиген, и содержит по меньшей мере одну CDR. Использование терминов «антигенсвязывающий домен» и «антитело» включает целые антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их части и, кроме того, включает одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные антитела мыши-человека, моноклональные антитела мыши-примата, примата-человека, антиидиотипические антитела, конструкции антител, такие как, например, scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' и F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb и Fd, Fv с дисульфидной связью (dsFc) и полипептиды, связанные с антителами.

[178] В некоторых аспектах «антигенсвязывающая часть» относится к полипептидной последовательности, которая вступает в контакт с антигеном, включая, но не ограничиваясь этим, CDR, полученные из антитела.

[179] Антигенсвязывающая часть также может быть включена в однодоменные антитела, макситела, минитела, наноантитела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие участки также можно прививать в каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны минитела на основе полипептида фибронектина). Таким образом, термины «антигенсвязывающий домен» и «антитело» включают также имитаторы антител на основе каркаса домена фибронектина типа III (монотел), другие каркасные системы (например, тенасцин), в которые привиты один или более CDR, аптамеры, так далее.

[180] Термины «антигенсвязывающий домен» и «антитело» также включают другие подходящие антигенсвязывающие домены, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, например, наноантитело, антитело VHH, DARPin (сконструированные белки с анкириновыми повторами), аффитело, монотело, аднектин, альфатело, альбумин-связывающий домен, адхирон, аффилин и другие искусственные белки, полученные из гамма-В-кристаллина, аффимер, аффитин (NANOFITIN™), антикалин, белки с повторами Armadillo (белки с повторами ARM, такие как, например, β-катенин, альфа-импортин, плакоглобин, аденоматозный полипоз толстой кишки, ARMC4, ARMCX3 и т. д.), атример (например, тетранектин и производные белки), авимер/макситело, центирин, финомер и другие белки, происходящие из домена Fyn SH3, домен Кунитца, Obody/OB-fold, пронектин, Repobody или любой синтетический и/или сконструированный с помощью компьютерных расчетов связывающий белок или каркас.

[181] Модульную архитектуру антител использовали для создания более 60 различных форматов биспецифических или полиспецифических антител. Соответственно, в некоторых аспектах антитело может быть в формате, выбранном, например, из crossMab, DAF (Fab двойного действия) (два в одном), DAF (четыре в одном), DutaMab, DT-IgG, общей LC «выступы-во-впадины», сборки «выступы-во-впадины», пары зарядов, обмена Fab-плечами, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y (биспецифического антитела с лейциновой застежкой, индуцирующего гетеродимеризацию двух HC), Fcab, Кл-тела, ортогонального Fab, DVD-IgG (двойного переменного домена IgG), IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-

scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, КИИ IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybodу, DVI-IgG (четыре в одном), наноантитела, наноантитела-HSA, BiTE (привлекающего Т-клетки биспецифического активатора), диатела, DART (перенацеливающегося антитела с двойной аффинностью), TandAb (тандемного антитела), одноцепочечного диатела, одноцепочечного диатела-CH₃, тройного тела, миниантитела, минитела, миниантитела TriBi, scFv-CH₃ КИИ, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂, F(ab')₂-ScFv₂, scFv-КИИ, Fab-scFv-Fc, тетравалентного Ат только из HC, одноцепочечного диатела-Fc, диатела-Fc, тандемного scFv-Fc, интратела, DOCK-AND-LOCK, ImmTAC, HSA-тела, одноцепочечного диатела-HSA, тандемного scFv-токсина, IgG-IgG, Cov-X-тела и scFv1-PEG-scFv₂.

[182] «Антигенсвязывающий домен» и «антитело» также включают биспецифические и полиспецифические антитела при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, например, scFv.

[183] Термин «scFv» относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере одну часть антитела, содержащую варибельную область легкой цепи, и по меньшей мере одну часть антитела, содержащую варибельную область тяжелой цепи, где варибельные области легкой и тяжелой цепей смежно соединены, например, через синтетический линкер, например, короткий гибкий полипептидный линкер, и способный экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, при этом scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, в контексте данного документа scFv может иметь варибельные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-терминального и C-терминального концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

[184] Термин «определяющая комплементарность область» или «CDR», как используется в данном документе, относится к последовательностям аминокислот в варибельных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и аффинность связывания. Например, как правило, имеется три CDR в каждой варибельной области тяжелой цепи (например, HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR в каждой варибельной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3). Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR можно определить с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (схема нумерации «Kabat»), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации «Chothia»), или их комбинацию. В соответствии со схемой нумерации Kabat в некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки CDR в варибельном домене тяжелой цепи (VH) имеют номера 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в варибельном домене легкой цепи (VL) имеют номера 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). В соответствии со

схемой нумерации Chothia в некоторых вариантах осуществления аминокислоты CDR в VH имеют номера 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в VL пронумерованы 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). В комбинированной схеме нумерации Kabat и Chothia в некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют аминокислотным остаткам, которые являются частью CDR Kabat, CDR Chothia или обоих. Например, в некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют аминокислотным остаткам 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH, например, VH млекопитающего, например, VH человека; и аминокислотные остатки 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL, например, VL млекопитающего, например, VL человека.

[185] Термин «антиген» относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может предполагать или выработку антител, или активацию специфичных иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Более того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК.

[186] В контексте данного документа термин «эпитоп» относится к фрагментам антигена, которые специфически взаимодействуют с молекулой антитела. Такие фрагменты, называемые в данном документе эпитопными детерминантами, как правило, содержат или являются частью таких элементов, как боковые цепи аминокислот или боковые цепи сахаров. Эпитопная детерминанта может быть определена, например, способами, известными в данной области техники, например, с помощью кристаллографии или водородно-дейтериевого обмена. По меньшей мере один или более фрагментов молекулы антитела, которые специфически взаимодействуют с эпитопной детерминантой, обычно расположены в CDR. Как правило, эпитоп имеет специфические трехмерные структурные характеристики. Как правило, эпитоп имеет специфические зарядовые характеристики. Некоторые эпитопы являются линейными эпитопами, в то время как другие являются конформационными эпитопами.

[187] Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от того же индивида, которому впоследствии он будет вводиться.

[188] Термин «химерный антигенный рецептор» или альтернативно «CAR» относится к набору полипептидов, как правило, двух в простейшей форме, которые, попадая в иммунную эффекторную клетку, придают клетке специфичность в отношении клетки-мишени, обычно раковой клетки, и обеспечивают генерацию внутриклеточного сигнала. В некоторых аспектах CAR содержит по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый «внутриклеточный сигнальный домен»), содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, как определено ниже. В некоторых аспектах набор полипептидов находится в одной и той же полипептидной цепи, например, включает

химерный слитый белок. В некоторых аспектах набор полипептидов не является смежным друг с другом, например, находится в разных полипептидных цепях. В некоторых аспектах набор полипептидов включает переключатель димеризации, который в присутствии молекулы димеризации может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах стимулирующей молекулой CAR является дзета-цепь, ассоциированная с комплексом Т-клеточного рецептора (CD3-дзета). В некоторых аспектах цитоплазматический сигнальный домен включает первичный сигнальный домен (например, первичный сигнальный домен CD3-дзета). В некоторых аспектах цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или более функциональных сигнальных доменов происходящих из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, определенной ниже. В некоторых аспектах костимулирующая молекула выбрана из костимулирующих молекул, описанных в данном документе, например, 4-1BB, CD27 и/или CD28.

[189] В некоторых аспектах CAR содержит химерный слитый белок, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, где антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен связаны при помощи спейсера CAR. В некоторых аспектах CAR содержит химерный слитый белок, содержащий антигенсвязывающий домен, связанный с трансмембранным доменом через спейсер CAR, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых аспектах CAR содержит химерный слитый белок, содержащий антигенсвязывающий домен, связанный с трансмембранным доменом через спейсер CAR, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых аспектах CAR содержит химерный слитый белок, содержащий антигенсвязывающий домен, связанный с трансмембранным доменом через спейсер CAR, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых аспектах CAR содержит необязательную лидерную последовательность на аминоконце (N-конце) CAR. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит лидерную последовательность на N-конце антигенсвязывающего домена, при этом лидерная последовательность необязательно отщепляется от антигенсвязывающего домена (например, scFv) во время клеточного процессинга и локализации CAR в клеточной мембране.

[190] Термин «злокачественное новообразование» относится к заболеванию, которое характеризуется неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки

могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных злокачественных новообразований описаны в данном документе, к ним относится, помимо прочего, рак молочных желез, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого и т. п. Термины «опухоль» и «злокачественное новообразование» используются в данном документе взаимозаменяемо, например, оба термина охватывают солидные и жидкие, например, диффузные или циркулирующие опухоли. В контексте данного документа термин «злокачественное новообразование» или «опухоль» включает предзлокачественные, а также злокачественные новообразования и опухоли.

[191] Термины «ассоциированный со злокачественным новообразованием антиген» или «опухолевый антиген» или их варианты взаимозаменяемо относятся к молекуле (обычно белковой, углеводной или липидной), которая преимущественно экспрессируется на поверхности раковой клетки либо полностью, либо в виде фрагмента (например, МНС/пептид), по сравнению с нормальной клеткой, и которая может использоваться для преимущественного нацеливания фармакологического агента на раковую клетку. В некоторых аспектах опухолевый антиген представляет собой маркер, экспрессируемый как нормальными клетками, так и раковыми клетками, например, маркер линии дифференцировки, например, CD19 на В-клетках. В некоторых аспектах опухолевый антиген получен из рака, включая, но не ограничиваясь этим, первичную или метастатическую меланому, тимому, лимфому, саркому, рак легкого, рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лейкемию, рак матки, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки и аденокарциномы, такие как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы и т.п.

[192] В некоторых аспектах опухолевый антиген представляет собой антиген, общий для конкретного пролиферативного нарушения. В некоторых аспектах ассоциированный со злокачественным новообразованием антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая сверхэкспрессируется в раковой клетке по сравнению с нормальной клеткой, например, 1-кратное повышение экспрессии, 2-кратное повышение экспрессии, 3-кратное повышение экспрессии или более по сравнению с нормальной клеткой. В некоторых аспектах ассоциированный со злокачественным новообразованием антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая неправильно синтезируется в раковой клетке, например, молекулу, которая содержит делеции, добавления или мутации по сравнению с молекулой, экспрессируемой в нормальной клетке. В некоторых аспектах ассоциированный со злокачественным новообразованием будет экспрессироваться исключительно на клеточной поверхности раковой клетки, целиком или в виде фрагмента (например, МНС/пептида), и не будет синтезироваться или экспрессироваться на поверхности нормальной клетки.

[193] Термин «противораковый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, помимо прочего, например,

уменьшение объема опухоли, уменьшение количества раковых клеток, уменьшение количества метастаз, увеличение вероятной продолжительности жизни, снижение пролиферации раковых клеток, снижение выживаемости раковых клеток или облегчение различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием.

[194] «Противораковый эффект» также может проявляться способностью CAR, полинуклеотидов, кодирующих CAR, векторов и клеток, описанных в данном документе, в первую очередь предотвращать возникновение рака. Термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь, например, уменьшением объема опухоли, уменьшением количества опухолевых клеток, уменьшением пролиферации опухолевых клеток или снижением выживаемости опухолевых клеток.

[195] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой консервативную аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, при замене аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей замена считается консервативной. В другом аспекте последовательность аминокислот может быть консервативно заменена структурно аналогичной последовательностью, которая отличается порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.

[196] Замены неконсервативных аминокислот включают те, в которых (i) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, (*например*, Arg, His или Lys), заменен электроотрицательным остатком (*например*, Glu или Asp), (ii) гидрофильный остаток (*например*, Ser или Thr) заменен гидрофобным остатком (*например*, Ala, Leu, Ile, Phe или Val), (iii) цистеин или пролин заменен любым другим остатком, или (iv) остаток, имеющий объемную гидрофобную или ароматическую боковую цепь, (*например*, Val, His, Ile или Trp), заменен остатком, имеющим меньшую боковую цепь, (*например*, Ala или Ser), или не имеет боковую цепь (*например*, Gly).

[197] Также можно использовать другие аминокислотные замены. Например, для аминокислоты аланина замена может быть взята из любого из D-аланина, глицина, бета-аланина, L-цистеина и D-цистеина. Для лизина заменой может быть любой из D-лизина, аргинина, D-аргинина, гомоаргинина, метионина, D-метионина, орнитина или D-орнитина. Как правило, замены в функционально важных областях, которые, как можно ожидать, будут вызывать изменения свойств выделенных полипептидов, представляют

собой замены, в которых (i) полярный остаток, например, серин или треонин, заменен (или замещен) гидрофобным остатком, например, лейцином, изолейцином, фенилаланином или аланином; (ii) остаток цистеина заменен (или замещен) любым другим остатком; (iii) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, например, лизин, аргинин или гистидин, заменен (или замещен) остатком, имеющим электроотрицательную боковую цепь, например, глутаминовой кислотой или аспарагиновой кислотой; или (iv) остаток, имеющий объемную боковую цепь, например, фенилаланин, заменен (или замещен) остатком, не имеющим такой боковой цепи, например, глицином. Вероятность того, что одна из вышеперечисленных неконсервативных замен может изменить функциональные свойства белка, также коррелирует с положением замены по отношению к функционально важным участкам белка: соответственно, некоторые неконсервативные замены могут оказывать незначительное влияние или совсем не влиять на биологические свойства.

[198] В содержании настоящего описания термины «мутация» и «аминокислотная замена», как они определены выше (иногда называемые просто «заменой»), считаются взаимозаменяемыми.

[199] В контексте настоящего изобретения замены (даже если они называются аминокислотными заменами) осуществляются на уровне нуклеиновой кислоты, *т.е.* замена аминокислотного остатка на альтернативный аминокислотный остаток осуществляется путем замены кодона, кодирующего первую аминокислоту, кодоном, кодирующим вторую аминокислоту.

[200] В контексте данного документа термин «гомология» относится к общему сходству между полимерными молекулами, *например*, между молекулами нуклеиновой кислоты (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Обычно термин «гомология» подразумевает эволюционные отношения между двумя молекулами. Таким образом, две гомологичные молекулы будут иметь общего эволюционного предка. В контексте данного документа термин «гомология» охватывает как идентичность, так и сходство.

[201] В некоторых аспектах полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99% мономеров в молекуле идентичны (точно такой же мономер) или подобны (консервативные замены). Термин «гомологичный» обязательно относится к сравнению по меньшей мере двух последовательностей (полинуклеотидных или полипептидных последовательностей).

[202] В контексте данного документа термин «идентичность» относится к общей консервативности мономера между полимерными молекулами, *например*, между молекулами полипептидов или молекулами полинуклеотидов (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК). Термин «идентичный» без каких-либо дополнительных определителей, *например*, белок А идентичен белку В, подразумевает, что последовательности идентичны на 100% (100% идентичность последовательностей). Описание двух последовательностей как, *например*, «на 70% идентичные» эквивалентно описанию их как имеющих, *например*, «70% идентичности последовательностей».

[203] Например, вычисление процентной идентичности двух полипептидных последовательностей может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (*например*, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй полипептидных последовательностей для оптимального выравнивания и неидентичные последовательности могут игнорироваться с целью сравнения). В определенных аспектах длина последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% длины эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислоты в соответствующих аминокислотных положениях.

[204] Когда положение в первой последовательности занято той же аминокислотой, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих положений в последовательностях с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма.

[205] Подходящие программы из системы программного обеспечения доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для определения процента идентичности последовательностей является *bl2seq*, часть набора программ BLAST, доступная на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США (blast.ncbi.nlm.nih.gov). *Bl2seq* выполняет сравнение между двумя последовательностями, применяя либо алгоритм BLASTN, либо алгоритм BLASTP. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, *например*, *Needle*, *Stretcher*, *Water* или *Matcher*, часть пакета программ биоинформатики EMBOSS, которые также доступны в Европейском институте биоинформатики (EBI) по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[206] Выравнивание последовательностей можно проводить с использованием

способов, известных в данной области техники, таких как MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X или Clustal Omega), MUSCLE и т.д.

[207] Каждая из различных областей в одной целевой полинуклеотидной или полипептидной последовательности, выравниваемой с эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательностью, может обладать собственной процентной идентичностью последовательностей. Отмечают, что процентное значение идентичности последовательности округляют до ближайшей десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляются до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет представлять собой целое число.

[208] В определенных аспектах процент идентичности (% ID) первой аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) со второй аминокислотной последовательностью (или последовательностью нуклеиновой кислоты) рассчитывается как $\% \text{ ID} = 100 \times (Y/Z)$, где Y представляет собой количество аминокислотных остатков (или нуклеотидных оснований), оцененных как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (при выравнивании путем визуального осмотра или конкретной программы выравнивания последовательностей), а Z представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше, чем длина второй последовательности, процент идентичности первой последовательности со второй последовательностью будет выше, чем процент идентичности второй последовательности с первой последовательностью.

[209] Специалисту в данной области техники будет понятно, что построение выравнивания последовательностей для расчета процента идентичности последовательностей не ограничивается бинарным сравнением двух последовательностей, обусловленным исключительно первичными данными о последовательностях. Также будет понятно, что выравнивания последовательностей могут быть получены путем интеграции данных последовательностей с данными из гетерогенных источников, таких как структурные данные (*например*, кристаллографические структуры белков), функциональные данные (*например*, местоположение мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, которая объединяет разнородные данные для получения множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная на сайте www.tcoffee.org или в качестве альтернативы доступная, *например*, в EBI. Также будет понятно, что окончательное выравнивание, используемое для расчета процента идентичности последовательностей, может быть проведено автоматически или вручную.

[210] В контексте данного документа термин «сходство» относится к общему сходству между полимерными молекулами, *например*, между полинуклеотидными молекулами (*например*, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. Расчет процентного сходства полимерных молекул друг с другом может быть выполнен таким же образом, как и расчет процентной идентичности,

за исключением того, что при расчете процентного сходства учитываются консервативные замены, как понимается в данной области техники. Следует понимать, что процент сходства зависит от используемой шкалы сравнения, т.е. от того, сравниваются ли аминокислоты, например, в соответствии с их эволюционной близостью, зарядом, объемом, гибкостью, полярностью, гидрофобностью, ароматичностью, изоэлектрической точкой, антигенностью или их комбинациями.

[211] В контексте данного документа термины «выделенный», «очищенный», «экстрагированный» и их грамматические варианты используются взаимозаменяемо и относятся к получению желаемой композиции по настоящему изобретению, например, CAR по настоящему изобретению, который прошел один или более процессов очистки. В некоторых аспектах выделение или очистка, как используется в данном документе, представляет собой процесс удаления, частичного удаления (например, фракции) композиции по настоящему изобретению, например, CAR по настоящему изобретению, из образца, содержащего примеси.

[212] В некоторых аспектах выделенная композиция не имеет обнаруживаемой нежелательной активности или, альтернативно, уровень или количество нежелательной активности находится на приемлемом уровне или в приемлемом количестве или ниже приемлемого уровня или количества. В других аспектах выделенная композиция имеет количество и/или концентрацию желаемой композиции по настоящему изобретению на уровне или выше приемлемого количества и/или концентрации, и/или активности. В других аспектах выделенная композиция обогащена по сравнению с исходным материалом, из которого получена композиция. Это обогащение может составлять по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99%, по меньшей мере около 99,9%, по меньшей мере около 99,99%, по меньшей мере около 99,999%, по меньшей мере около 99,9999% или более 99,9999% относительно исходного материала.

[213] В некоторых аспектах выделенные препараты по существу не содержат остаточные биологические продукты. В некоторых аспектах выделенные препараты являются свободными на 100%, по меньшей мере около 99%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 91% или свободными на по меньшей мере около 90% от любых загрязняющих биологических веществ. Остаточные биологические продукты могут включать абиотические материалы (включая химические вещества) или

нежелательные нуклеиновые кислоты, белки, липиды или метаболиты.

[214] «Нуклеиновая кислота», «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотидная последовательность», «полинуклеотид» и их грамматические варианты используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме фосфатного эфира рибонуклеозидов (аденозин, гуанозин, уридин или цитидин; «молекулы РНК») или дезоксирибонуклеозиды (дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезокситимидин или дезоксицитидин; «молекулы ДНК»), или любые их фосфозфирные аналоги, такие как фосфоротиоаты и тиоэфиры, либо в одноцепочечной форме, либо в двухцепочечной спирали. Последовательности одноцепочечных нуклеиновых кислот относятся к одноцепочечной ДНК (оцДНК) или одноцепочечной РНК (оцРНК). Возможны двухцепочечные спирали ДНК-ДНК, ДНК-РНК и РНК-РНК. Термин молекула нуклеиновой кислоты и, в частности, молекула ДНК или РНК, относится только к первичной и вторичной структуре молекулы и не ограничивает ее какими-либо конкретными третичными формами. Таким образом, этот термин включает двухцепочечную ДНК, обнаруженную, среди прочего, в линейных или кольцевых молекулах ДНК (например, рестрикционных фрагментах), плазидах, суперспиральных ДНК и хромосомах. При обсуждении структуры конкретных двухцепочечных молекул ДНК последовательности могут быть описаны в данном документе в соответствии с традиционной конвенцией, согласно которой приводится только последовательность в направлении от 5' к 3' вдоль нетранскрибируемой цепи ДНК (т.е. цепи, имеющей последовательность, гомологичную мРНК).

[215] «Молекула рекомбинантной ДНК» представляет собой молекулу ДНК, подвергшуюся молекулярно-биологической манипуляции. ДНК включает, но не ограничивается ими, кДНК, геномную ДНК, плазмидную ДНК, синтетическую ДНК и полусинтетическую ДНК. «Композиция нуклеиновой кислоты» по настоящему изобретению содержит одну или более нуклеиновых кислот, как описано в данном документе.

[216] В контексте данного документа термин «полинуклеотид» относится к полимерам нуклеотидов любой длины, включая рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, их аналоги или их смеси. Этот термин относится к первичной структуре молекулы. Таким образом, термин включает трех-, двух- и одноцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту («ДНК»), а также трех-, двух- и одноцепочечную рибонуклеиновую кислоту («РНК»). Он также включает модифицированные, например, путем алкилирования и/или кэппирования, и немодифицированные формы полинуклеотида. Более конкретно, термин «полинуклеотид» включает полидезоксирибонуклеотиды (содержащие 2-дезокси-D-рибозу), и полирибонуклеотиды (содержащие D-рибозу), включая мРНК, сплайсированные или несплайсированные, любой другой тип полинуклеотида, который представляет собой N- или C-гликозид пуринового или пиримидинового основания, и другие полимеры, содержащие ненуклеотидные остовы, например, полиамид (например, пептидные нуклеиновые кислоты «ПНК») и полиморфолиновые полимеры, а также другие синтетические

полимеры нуклеиновых кислот, специфичные для последовательности, при условии, что полимеры содержат нуклеиновые основания в конфигурации, которая допускает спаривание оснований и стекинг оснований, как, например, в ДНК и РНК.

[217] В некоторых аспектах описанный в данном документе полинуклеотид содержит ДНК, например, ДНК, встроенную в вектор. В других аспектах описанный в данном документе полинуклеотид содержит мРНК. В некоторых аспектах мРНК представляет собой синтетическую мРНК. В некоторых аспектах синтетическая мРНК содержит по меньшей мере одно неприродное нуклеиновое основание. В некоторых аспектах все нуклеиновые основания определенного класса заменены неприродными нуклеиновыми основаниями (*например*, все уридины в полинуклеотиде, описанном в данном документе, могут быть заменены неприродным нуклеиновым основанием, *например*, 5-метоксиуридином).

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

[219] Если не указано иное, нуклеотидная последовательность, «кодирующая» аминокислотную последовательность», *например*, полинуклеотид, «кодирующий» CAR по настоящему изобретению, включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность.

[220] Термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой промотором.

[221] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может содержать модифицированные аминокислоты. Кроме того, указанные термины включают аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; *например*, образование дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такие как конъюгация с меченым компонентом. Также в определение включены, *например*, полипептиды, содержащие один

или более аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты, такие как гомоцистеин, орнитин, п-ацетилфенилаланин, D-аминокислоты и креатин), а также как и другие модификации, известные в данной области техники.

[222] Термин «полипептид» в контексте данного документа относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. Полипептиды включают генные продукты, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного. Полипептид может представлять собой отдельный полипептид или может представлять собой многомoleкулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут содержать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды. Чаще всего дисульфидные связи обнаруживаются в многоцепочечных полипептидах. Термин «полипептид» может также применяться к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются искусственным химическим аналогом соответствующей встречающейся в природе аминокислоты. В некоторых аспектах «пептид» может иметь длину не более 50 аминокислот, *например*, около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

[223] «Рекомбинантный» полипептид или белок относится к полипептиду или белку, полученному с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Полученные рекомбинантным путем полипептиды и белки, экспрессируемые в сконструированных клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были разделены, фракционированы или частично или по сути очищены с помощью любой подходящей методики. Полипептиды, описанные в данном документе, могут быть получены рекомбинантным способом с использованием способов, известных в данной области техники. В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению получают рекомбинантным путем. В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению продуцируются клетками, например, Т-клетками, после трансфекции по меньшей мере одним полинуклеотидным вектором, кодирующим CAR по настоящему изобретению.

[224] В контексте данного документа термин «фрагмент» полипептида (например, петля Ig) относится к аминокислотной последовательности полипептида, которая короче природной последовательности, N- и/или C-концевая часть удалена или любая часть полипептида удалена по сравнению с природным полипептидом. Таким образом, нет необходимости, чтобы во фрагменте были удалены только N- и/или C-концевые аминокислоты. Полипептид, в котором удалены внутренние аминокислоты по сравнению с природной последовательностью, также считается фрагментом.

[225] В контексте данного документа термин «функциональный фрагмент» относится к фрагменту полипептида, который сохраняет функцию полипептида. Соответственно, в некоторых аспектах функциональный фрагмент шарнира Ig сохраняет способность позиционировать антигенсвязывающий домен (например, scFv) в CAR на таком расстоянии от эпитопа-мишени (например, опухолевого антигена), что

антигенсвязывающий домен (например, scFv) может эффективно взаимодействовать с эпитопом-мишенью (например, опухолевым антигеном).

[226] С помощью любых известных из уровня техники методов определения связывания CAR, содержащего спейсер, с целевым антигеном и активации Т-клеток, включая, например, вестерн-блоттинг, анализ FACS, анализ секреции цитокинов, анализ выживаемости клеток и т.д., можно оценить, является ли шарнирный фрагмент Ig функциональным фрагментом. В определенных аспектах функциональный фрагмент шарнира Ig представляет собой фрагмент, который при использовании в качестве спейсера в CAR дает CAR с, например, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или около 100% активности эталонного CAR. В контексте данного документа термин «эталонный CAR» относится к соответствующему CAR, содержащему те же структурные компоненты, что и тестируемый CAR, но с другим спейсером («эталонный спейсер»). В некоторых аспектах эталонный спейсер представляет собой, например, спейсер IgG1, то есть спейсер, соответствующий шарнирным областям IgG1.

[227] Используя известные методы белковой инженерии и технологии рекомбинантных ДНК, могут быть созданы варианты для улучшения или изменения характеристик полипептидов. Например, одна или более аминокислот могут быть удалены с N-конца или C-конца секретируемого белка без существенной потери биологической функции. В работе Ron et al., *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме, сообщается о вариантах белков KGF, обладающих гепарин-связывающей активностью даже после делеции 3, 8 или 27 аминоконцевых аминокислотных остатков. Подобным образом, гамма-интерферон проявлял до десяти раз более высокую активность после удаления 8-10 аминокислотных остатков из карбоксиконца этого белка. (Публикация Dobeli et al., *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.)

[228] Более того, имеется достаточно доказательств того, что варианты часто сохраняют биологическую активность, сходную с таковой у встречающегося в природе белка. Например, в работе Gaule и сотрудников (*J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993), включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме) проведен обширный мутационный анализ цитокина IL-1a человека. Они использовали случайный мутагенез для создания более 3500 отдельных мутантов IL-1a, в которых в среднем выполняли 2,5 изменения аминокислот на вариант по всей длине молекулы. В каждой возможной аминокислотной позиции исследовали множество мутаций. Исследователи обнаружили, что «[большая] часть молекулы может быть изменена с небольшим влиянием

на что-либо из [связывания или биологической активности]». (См. Реферат). Фактически, только 23 уникальные аминокислотные последовательности из более чем 3500 исследованных нуклеотидных последовательностей продуцировали белок, который значительно отличался по активности от белка дикого типа.

[229] Как указано выше, варианты или производные включают, *например*, модифицированные полипептиды. В некоторых аспектах варианты или производные, *например*, полипептидов, полинуклеотидов, липидов, гликопротеинов, являются результатом химической модификации и/или эндогенной модификации. В некоторых аспектах варианты или производные являются результатом модификации *in vivo*. В некоторых аспектах варианты или производные являются результатом модификации *in vitro*. В еще других аспектах вариант или производные являются результатом внутриклеточной модификации в клетках-продуцентах, например, Т-клетках.

[230] Модификации, присутствующие в вариантах и производных, включают, *например*, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование ГФИ-якоря, гидроксильное, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (публикация Mei et al., Blood 116:270-79 (2010), содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например, аргинилирование и убиквитинирование.

[231] Термин «сигнальный домен» относится к функциональной части белка, который действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или действуя как эффекторы, отвечая на такие мессенджеры.

[232] Как используется в данном документе, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен может генерировать сигнал, который способствует иммунной эффекторной функции клетки, содержащей CAR, например, CART-клетки. Примеры иммунной эффекторной функции, например, в CART-клетке, включают цитолитическую активность и хелперную активность, включая секрецию цитокинов. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен представляет собой часть белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя можно использовать целый внутриклеточный сигнальный домен, во

многих случаях не обязательно использовать новую цепь. В случае применения усеченной части внутриклеточного сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо интактной цепи при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, это означает, что термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

[233] В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. К примерам первичных внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или стимуляцию, зависящую от антигена. Например, в случае CAR T первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность T-клеточного рецептора, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность корецептора или костимулирующей молекулы.

[234] Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры ITAM, содержащие первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают, но не ограничиваются ими, полученные из CD3-дзета, FcR-гамма, общий FcR-гамма (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон Rib), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcεRI, CD66d, CD32, DAP10 и DAP12.

[235] Термины «ковалентно связанный», «слитый» и их грамматические варианты используются взаимозаменяемо и относятся к первому фрагменту, например, первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенному ко второму фрагменту, например, второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, соответственно. Первый фрагмент может быть соединен напрямую или сопоставлен со вторым фрагментом, или, альтернативно, промежуточный фрагмент может ковалентно соединять первый фрагмент со вторым фрагментом. Термин «связанный» означает не только слияние первого фрагмента со вторым фрагментом на C-конце или N-конце, но также включает вставку целого первого фрагмента (или второго фрагмента) в любые две точки, *например*, аминокислоты, во втором фрагменте (или первом фрагменте, соответственно). В некоторых аспектах первая часть связана со второй частью пептидной связью или линкером. Первый фрагмент может быть связан со вторым фрагментом посредством фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может представлять собой пептид или полипептид (для полипептидных цепей), или нуклеотид или нуклеотидную

цепь (для нуклеотидных цепей), или любой химический фрагмент (для полипептидных или полинуклеотидных цепей или любых химических молекул).

[236] В контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» относится к одному или более соединениям, описанным в данном документе, таким как, например, CAR по настоящему изобретению или клетка, экспрессирующая CAR по настоящему изобретению, смешанная или перемешанная, суспендированная с одним или более другими химическими компонентами, такими как фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Одним из назначений фармацевтической композиции является облегчение введения препаратов, например, клеток, экспрессирующих CAR по настоящему изобретению, субъекту.

[237] Термины «эксципиент» и «носитель» используются взаимозаменяемо и относятся к инертной субстанции, добавляемой к фармацевтической композиции для дальнейшего облегчения введения соединения, например, CAR по настоящему изобретению.

[238] Термины «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемый наполнитель» и их грамматические вариации охватывают все агенты, одобренные регулирующим органом федерального правительства США или перечисленные в Фармакопее США для применения у животных, включая людей, а также любой носитель или разбавитель, который не вызывает образования нежелательных физиологических эффектов до такой степени, что запрещается введение композиции субъекту, и не отменяет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Включены эксципиенты и носители, которые пригодны при приготовлении фармацевтической композиции и обычно безопасны, нетоксичны и желательны.

[239] Термины «субъект», «пациент», «индивидуум» и «хозяин» и их варианты используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, включая, помимо прочего, людей, домашних животных (*например*, собак, кошек и т.п.), сельскохозяйственных животных (*например*, коров, овец, свиней, лошадей и т.п.) и лабораторных животных (*например*, обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и т.п.), для которых требуется диагностика, лечение или терапия, в частности, людей. Способы, описанные в данном документе, применимы как для лечения человека, так и для применения в ветеринарии.

[240] В контексте данного документа фраза «нуждающийся в этом субъект» включает субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которым было бы полезно введение CAR по настоящему изобретению, например, для улучшения гемостаза.

[241] В контексте данного документа термины «лечить», «лечение» или «лечащий» относятся, *например*, к снижению степени тяжести заболевания или патологического состояния; сокращению продолжительности течения болезни; улучшению или устранению одного или более симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием; обеспечению благоприятных эффектов у субъекта с заболеванием или патологическим состоянием без обязательного излечения заболевания или

патологического состояния. Термин также включает профилактику или предотвращение заболевания или состояния или его симптомов. В некоторых аспектах термин «лечение» или «процесс лечения» означает индукцию иммунного ответа у субъекта против антигена.

[242] Термины «предупредить», «предупреждение» и их варианты в контексте данного документа относятся к частичной или полной отсрочке начала заболевания, нарушения и/или состояния; частичной или полной отсрочке появления одного или нескольких симптомов, признаков или клинических проявлений конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; частичной или полной отсрочке появления одного или нескольких симптомов, признаков или проявлений конкретного заболевания, нарушения и/или состояния; частичному или полному замедлению прогрессирования определенного заболевания, нарушения и/или состояния и/или снижению риска развития патологии, связанной с заболеванием, нарушением и/или состоянием. В некоторых аспектах предотвращение исхода достигается за счет профилактического лечения.

[243] В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» означает количество реагента или фармацевтического соединения, содержащего CAR по настоящему изобретению, которого достаточно для получения желаемого терапевтического эффекта, фармакологического и/или физиологического эффекта у субъекта, нуждающегося в этом.

[244] Терапевтически эффективное количество может представлять собой «профилактически эффективное количество», поскольку профилактика может считаться терапией. Термин «профилактический» в контексте данного документа относится к терапевтическому или курсовому действию, используемому для предупреждения начала заболевания или состояния, или для предупреждения или отсрочки появления симптома, ассоциированного с заболеванием или состоянием. В контексте данного документа термин «профилактика» относится к мерам, принимаемым для поддержания здоровья и предотвращения возникновения заболевания или патологического состояния, или для предотвращения или задержки симптома, связанного с заболеванием или патологическим состоянием.

II. CAR со спейсерами, полученными из Ig

[245] В настоящем изобретении предложены спейсеры CAR, полученные из иммуноглобулина (Ig) (например, полученные из шарнирных областей или петлевых областей), которые применимы для клеток, экспрессирующих один или более химерных антигенных рецепторов. Эти спейсеры CAR содержат, например, шарнирные области IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE или IgM, их фрагменты (в отдельности или кэппированные дополнительными последовательностями, например последовательностями областей CH1 или CH2) или комбинации фрагментов шарнирных областей IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE или IgM. В некоторых аспектах спейсеры CAR содержат, например, петлевые области константного домена IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE или IgM, их фрагменты (отдельно или кэппированные дополнительными последовательностями, например, из смежных β -листов) или

комбинации фрагментов петлевых областей IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE или IgM. В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательности, полученные из шарнирной области, последовательности, полученные из петлевой области, или их комбинации.

[246] Соответственно, в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие CAR, содержащие, например, (i) антигенсвязывающий домен, (ii) трансмембранный домен, (iii) внутриклеточный домен и (iv) спейсер CAR, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области и/или петлевой области иммуноглобулина человека (Ig) (т. е. спейсера CAR по настоящему изобретению) и, необязательно, линкера (например, богатого глицином-серином линкера), где спейсер расположен между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к конструкции рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей трансген, кодирующий CAR по настоящему изобретению. В настоящем изобретении также предложен CAR, кодируемый одной или более полинуклеотидными последовательностями или векторами, описанными в данном документе. В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению разработан как стандартный CAR, разделенный CAR, CAR с выключенным переключателем, CAR с включенным переключателем, CAR первого поколения, CAR второго поколения, CAR третьего поколения, CAR четвертого поколения или CAR пятого поколения.

[247] В контексте данного документа термин «спейсер CAR» относится к полипептидной последовательности, которая способна ковалентно связывать вместе два разнесенных фрагмента: антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен CAR.

[248] Термины «спейсер CAR по настоящему изобретению» и «спейсер CAR, полученный из Ig» используются взаимозаменяемо для обозначения

(i) «спейсера CAR, полученного из шарнирной области», т.е. спейсера CAR, содержащего аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области, расположенной между константными доменами CH1 и CH2 иммуноглобулина человека, например, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE или IgM, и необязательно одна или более аминокислот из соседнего домена CH1 и/или CH2 или их комбинацию (например, спейсер CAR, полученный из нескольких конкатенированных шарнирных областей);

(ii) «спейсера CAR, полученного из петлевой области», т.е. спейсера CAR, содержащего аминокислотную последовательность, полученную из петлевой области константного домена иммуноглобулина человека, например, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE или IgM и, необязательно, одну или более аминокислот из соседней β -цепи или их комбинацию (например, спейсер CAR, полученный из нескольких конкатенированных петлевых областей); или

(iii) их комбинации (например, два или более конкатенированных спейсеров CAR, полученных из шарнирной области, и спейсеров CAR, полученных из петлевой области).

[249] В некоторых аспектах термин «спейсер CAR» по настоящему изобретению относится к подпоследовательности тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранной из

группы, состоящей из IgA1 человека (Uniprot: P01876, IGHA1_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина альфа 1; SEQ ID NO: 4994), IgA2 человека (Uniprot P01877, IGHA2_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина альфа 2; SEQ ID NO: 4995), IgG2A мыши (Uniprot P01665, GCAM_MOUSE, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 2A; SEQ ID NO: 4993), IgG1 человека (Uniprot P01857, IGHG1_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 1; SEQ ID NO: 4998), IgG2 человека (Uniprot P01859, IGHG2_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 2; SEQ ID NO: 4999), IgG3 человека (Uniprot P01860, IGHG3_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 3; SEQ ID NO: 5000), IgG4 человека (Uniprot P01861, IGHG4, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 4; SEQ ID NO: 5001), IgD человека (Uniprot P01880, IGHD_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина дельта; SEQ ID NO: 4996), IgE человека (Uniprot P01854, IGHE_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина дельта эpsilon; SEQ ID NO: 4997), или IgM (Uniprot P01871, IGHM_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина дельта мю; SEQ ID NO: 5002), при этом подпоследовательность содержит шарнирную область CH1-CH2 или ее часть. В некоторых аспектах подпоследовательность дополнительно содержит смежную часть константного домена CH1 и/или CH2.

[250] В некоторых аспектах термин «спейсер CAR» по настоящему изобретению относится к подпоследовательности тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранной из группы, состоящей из IgA1 человека (Uniprot: P01876, IGHA1_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина альфа 1; SEQ ID NO: 4994), IgA2 человека (Uniprot P01877, IGHA2_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина альфа 2; SEQ ID NO: 4995), IgG2A мыши (Uniprot P01665, GCAM_MOUSE, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 2A; SEQ ID NO: 4993), IgG1 человека (Uniprot P01857, IGHG1_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 1; SEQ ID NO: 4998), IgG2 человека (Uniprot P01859, IGHG2_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 2; SEQ ID NO: 4999), IgG3 человека (Uniprot P01860, IGHG3_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 3; SEQ ID NO: 5000), IgG4 человека (Uniprot P01861, IGHG4, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина гамма 4; SEQ ID NO: 5001), IgD человека (Uniprot P01880, IGHD_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина дельта; SEQ ID NO: 4996), IgE человека (Uniprot P01854, IGHE_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина дельта эpsilon; SEQ ID NO: 4997), или IgM (Uniprot P01871, IGHM_HUMAN, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина дельта мю; SEQ ID NO: 5002), при этом подпоследовательность содержит петлевую область константного домена или ее часть. В некоторых аспектах подпоследовательность дополнительно содержит смежную часть β -цепи.

[251] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит подпоследовательность, состоящую из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,

27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, или 80 аминокислот из шарнирной области иммуноглобулина SEQ ID NO: 4993-5002; или их комбинации.

[252] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит подпоследовательность, состоящую из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот из шарнирной области иммуноглобулина SEQ ID NO: 4993-5002, где подпоследовательность дополнительно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из области CH1, примыкающей к подпоследовательности шарнирной области; или их комбинации.

[253] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит подпоследовательность, состоящую из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот из шарнирной области иммуноглобулина SEQ ID NO: 4993-5002, где подпоследовательность дополнительно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из области CH2, примыкающей к подпоследовательности шарнирной области; или их комбинации.

[254] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит подпоследовательность, состоящую из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот из шарнирной области иммуноглобулина SEQ ID NO: 4993-5002, где подпоследовательность дополнительно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из области CH1, примыкающей к подпоследовательности шарнирной области, и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из области CH2, примыкающей к подпоследовательности шарнирной области; или их комбинации.

[255] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит спейсер, полученный из шарнирной области, и дополнительно содержит гибкий глицин-сериновый линкер, например, Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[256] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит подпоследовательность, состоящую из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот из петлевой области константного домена (например, CH1, CH2 или CH3) иммуноглобулина SEQ ID NO: 4993-5002; или их комбинации.

[257] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит подпоследовательность, состоящую из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,

27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот из петлевой области константного домена (например, СН1, СН2 или СН3) иммуноглобулина SEQ ID NO: 4993-5002, где подпоследовательность дополнительно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из β -цепи, примыкающей к С-концу подпоследовательности петлевой области; или их комбинации.

[258] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит подпоследовательность, состоящую из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, или 80 аминокислот из петлевой области константного домена (например, СН1, СН2 или СН3) иммуноглобулина SEQ ID NO: 4993-5002, где подпоследовательность дополнительно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из β -цепи, примыкающей к N-концу подпоследовательности петлевой области; или их комбинации.

[259] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит подпоследовательность, состоящую из 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, или 80 аминокислот из петлевой области константного домена (например, СН1, СН2 или СН3) иммуноглобулина SEQ ID NO: 4993-5002, где подпоследовательность дополнительно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из β -цепи, примыкающей к С-концу подпоследовательности петлевой области; и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из β -цепи, примыкающей к N-концу подпоследовательности петлевой области.

[260] В некоторых аспектах спейсер CAR содержит спейсер, полученный из петлевой области, и дополнительно содержит гибкий глицин-сериновый линкер, например, Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[261] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнирной области, описанной в данном документе, содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85% %, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4830-4842 и 4844-4859.

[262] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из петлевой области, описанной в данном документе, содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере

мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4843 (спейсер 15).

И.А. Спейсер CAR, полученный из IgD

[263] Иммуноглобулин D (IgD) представляет собой изотип антител, который составляет около 1% белков в плазматических мембранах незрелых В-лимфоцитов, где он обычно коэкспрессируется с другим антителом на клеточной поверхности, называемым IgM. Структурно IgD сходны с IgG.

[264] В контексте данного документа термин «шарнир IgD» относится к аминокислотной последовательности, расположенной между областями CH1 и областями CH2 тяжелой цепи IgD. Тяжелые цепи IgD содержат длинную шарнирную область, кодируемую двумя экзонами, расположенными между аминокислотными положениями 99 и 162. Один экзон кодирует шарнирную подобласть 1 (SEQ ID NO: 861), а второй экзон кодирует шарнирную субобласть 2 (SEQ ID NO: 1287). В некоторых аспектах настоящего изобретения «шарнир IgD» представляет собой удлиненный IgD, содержащий, т. е. последовательность, содержащую центральную область шарнира IgD из 64 аминокислот (подобласти 1 и 2) с С-концевым фрагментом CH2 из 13 аминокислот длиной SEQ ID NO: 2143. Таким образом, «полноразмерный шарнир IgD», как определено в настоящей заявке, содержит последовательность длиной 77 аминокислот SEQ ID NO: 1.

[265] В контексте данного документа термин «спейсер CAR, полученный из шарнира IgD» включает, например, спейсер, содержащий шарнирную подобласть 1 IgD и ее фрагменты, подобласть 2 шарнира IgD и ее фрагменты, фрагменты полноразмерной шарнирной области IgD с SEQ ID NO: 1 и их варианты, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот области CH1 и/или области CH2.

[266] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgD, по настоящему изобретению содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах спейсер, полученный из шарнира IgD, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 861, SEQ ID NO: 1287 и/или SEQ ID ON: 2143.

[267] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgD, способен индуцировать повышение уровня интерферона- γ , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[268] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgD, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по

меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911). В контексте данного документа термин «эталонный спейсер» относится к спейсеру, присутствующему в CAR до оптимизации путем замены исходного спейсера спейсером, описанным в данном документе. В некоторых аспектах эталонный спейсер представляет собой спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911). В некоторых аспектах эталонный спейсер может представлять собой любой спейсер, известный в данной области техники, например, спейсер, описанный в любом из документов, включенных посредством ссылки в настоящее описание.

[269] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgD, способен индуцировать повышенный уровень TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[270] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgD, по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах спейсер, полученный из шарнира IgD, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 861, SEQ ID NO: 1287 и/или SEQ ID ON: 2143.

[271] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgD, по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, описанной в **Таблице 1**.

Таблица 1: Спейсеры, полученные из IgD. SEQ ID NO: 1 представляет собой полноразмерный шарнир IgD.

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
-------	--------	-------	--------	-------	--------

77 (полноразмерный)	1	76	2-3	75	4-6
74	7-10	73	11-15	72	16-21
71	22-28	70	29-36	69	37-45
68	46-55	67	56-66	66	67-78
65	79-91	64	92-105	63	106-120
62	121-136	61	137-153	60	154-171
59	172-190	58	191-210	57	211-231
56	232-253	55	254-276	54	277-300
53	301-325	52	326-351	51	352-378
50	379-406	49	407-435	48	436-465
47	466-496	46	497-528	45	529-561
44	562-595	43	596-630	42	631-666
41	667-703	40	704-741	39	742-780
38	781-820	37	821-861	36	862-903
35	904-946	34	947-989	33	990-1034
32	1035-1080	31	1081-1126	30	1127-1174
29	1175-1223	28	1124-1273	27	1274-1324
26	1325-1376	25	1377-1429	24	1430-1483
23	1484-1538	22	1539-1594	21	1595-1651
20	1652-1709	19	1710-1768	18	1769-1828
17	1829-1889	16	1980-1951	15	1952-2014
14	2015-2078	13	2079-2043	12	2144-2209
11	2210-2276	10	2277-2344	9	2345-2413
8	2414-2473	7	2484-2559		

[272] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2015; SEQ ID NO: 1889; SEQ ID NO: 1768; SEQ ID NO: 1; и любой их комбинации.

[273] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%,

по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной SEQ ID NO: 2015.

[274] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 1889.

[275] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 1.

[276] В некоторых аспектах спейсер содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 1768.

[277] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgD, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 1**, или последовательность, показанную где-либо в настоящем описании, дополнительно содержащую N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgD из **Таблицы 2**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgD из **Таблицы 1** или последовательности, показанной где-либо в настоящем описании.

[278] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgD, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 1**, или последовательность, показанную где-либо в настоящем описании, дополнительно содержащую C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgD из **Таблицы 2**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgD из **Таблицы 1** или последовательности, показанной где-либо в настоящем описании.

[279] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgD, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 1**, или последовательность, показанную где-либо в настоящем описании, дополнительно содержащую (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислот C-концевого домена IgD CH1 из **Таблицы 2**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgD из **Таблицы 1**, или последовательности, показанной где-

либо в настоящем описании, и (ii) С-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgD из **Таблицы 2**, ковалентно связанную с С-концом последовательности IgD из **Таблицы 1** или последовательности, показанной где-либо в настоящем описании.

[280] Последовательности CH1 и CH2 IgD, которые могут быть присоединены к N-и/или С-концам последовательностей спейсера CAR, полученных из шарнира IgD, из **Таблицы 1** или последовательности, показанной где-либо в настоящем описании, представлены в **Таблице 2**.

Таблица 2: IgD. Необязательные N-концевые последовательности CH1 и С-концевые последовательности CH2 из CH1 и CH2 (последовательности из Uniprot P01880-1, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полный шарнир IgD SEQ ID NO:1)

CH1		CH2	
Длина	Последовательность	Длина	Последовательность
1	F	1	A
2	IF	2	AV
3	EIF	3	AVQ
4	KEIF (SEQ ID NO:4519)	4	AVQD (SEQ ID NO:4521)
5	KKEIF (SEQ ID NO:4520)	5	AVQDL (SEQ ID NO:4522)

II.B. Спейсер CAR, полученный из шарнира IgA

[281] IgA представляет собой антитело, которое играет решающую роль в иммунной функции слизистых оболочек и составляет до 15% от общего количества иммуноглобулинов, продуцируемых в организме. IgA имеет подклассы: IgA1 и IgA2. В IgA2 тяжелая и легкая цепи связаны не дисульфидными, а нековалентными связями.

[282] Шарнирная область значительно различается между двумя изоформами IgA. Шарнирная область IgA1 состоит из 23 остатков (SEQ ID NO: 2560) и 5 сайтов O-гликозилирования, в то время как шарнирная область IgA2 состоит из 10 остатков (SEQ ID NO: 2713) и не содержит сайтов гликозилирования. Обе шарнирные области расположены на Cys220 в цепи Ch1 и заканчиваются на Pro244 Ch2.

[283] В контексте данного документа термин «шарнир IgA1» относится к шарнирному участку, расположенному между областями CH1 и CH2 IgA1, имеющего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2560.

[284] В контексте данного документа термин «спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1» включает, например, спейсеры, содержащие полный шарнир IgA1 SEQ ID NO: 2560 и его фрагменты, а также их варианты, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот области CH1 и/или области CH2.

[285] Следовательно, в некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2560. Следовательно, в некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных

аминокислот SEQ ID NO: 2560. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2560.

[286] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgA1, способен индуцировать повышение уровня интерферона- γ , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[287] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgA1, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[288] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из IgA1, способен индуцировать повышенный уровень TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[289] В контексте данного документа термин «шарнир IgA2» относится к последовательности IgA2, расположенной между Cys220 на С-конце константного домена CH1 тяжелой цепи IgA2 и Pro244 на N-конце константного домена CH2 тяжелой цепи IgA2. В некоторых аспектах полноразмерный шарнир IgA2 состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2713. В контексте данного документа термин «шарнир IgA2» охватывает шарниры различных аллотипов IgA2, например, IgA2m, IgA2(m1), IgA2(m2) или IgA2(n). Первый Pro в каноническом шарнире IgA2 SEQ ID NO: 2713, описанном выше, представляет собой Arg в шарнире аллотипа IgA2(m2) (т.е. он начинается с RV вместо PV). Соответственно, спейсеры CAR IgA2 по настоящему

изобретению охватывают также формы, в которых аминокислоты пролины, соответствующие положению 1 из SEQ ID NO: 2713 (например, соответствующие аминокислоты, присутствующие во фрагментах IgA2 или любых производных последовательностях IgA2), заменены аргининами.

[290] В контексте данного документа термин «спейсер CAR, полученный из IgA2» включает, например, спейсеры, содержащие полный шарнир IgA2 SEQ ID NO: 2713 и его фрагменты, а также их варианты, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот области CH1 и/или области CH2. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из IgA2, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 4848. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из IgA2, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4848.

[291] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgA2, способен индуцировать повышение уровня интерферона- γ , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[292] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgA2, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[293] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgA2, способен индуцировать повышенный уровень TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[294] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из IgA2, по настоящему изобретению может, например, иметь последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4523 (т. е. шарнирную последовательность IgA2 с N-концевой последовательностью VPC из CH1), SEQ ID NO: 4850, SEQ ID NO: 4524 (т. е. спейсерную последовательность IgA2 с N-концевой последовательностью VPC из CH1 и C-концевой последовательностью PR из CH2) или SEQ ID NO: 4525 (т. е. спейсерную последовательность IgA2 с N-концевой последовательностью PC из CH1 и C-концевой последовательностью P из CH2), где N-концевые подпоследовательности VCP и PC из SEQ ID NO: 3523, 4524 и 4525 получены из области CH1, а C-концевые подпоследовательности PR и P из SEQ ID NO: 4524 и 4525 получены из области CH2 иммуноглобулина IgA2.

[295] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, описанной в **Таблице 3**.

Таблица 3: Спейсеры, полученные из IgA1

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
23	2560	22	2561-2562	21	2563-2665
20	2566-2569	19	2570-2574	18	2575-2580
17	2581-2587	16	2588-2595	15	2596-2604
14	2605-2614	13	2615-2625	12	2626-2637
11	2638-2650	10	2651-2644	9	2665-2679
8	2680-2695	7	2696-2712		

[296] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4845; SEQ ID NO: 4846; SEQ ID NO: 4847; SEQ ID NO: 4848; SEQ ID NO: 4849; SEQ ID NO: 4850; SEQ ID NO: 4851; SEQ ID NO: 2560; SEQ ID NO: 4844; и любой их комбинации.

[297] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4847.

[298] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по

меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4845.

[299] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4846.

[300] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2560.

[301] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4844.

[302] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 3**, или любой спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, описанный в данном документе, дополнительно содержащий N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA1 из **Таблицы 4**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgA1 из **Таблицы 3**, или любой спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, описанный в данном документе.

[303] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 3**, или любой спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, описанный в данном документе, дополнительно содержащий C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA1 из **Таблицы 4**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgA2 из **Таблицы 3**, или любой спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, описанный в данном документе.

[304] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 3**, или любой спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, описанный в данном документе, дополнительно содержащий (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA1 из **Таблицы 4**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgA1 из **Таблицы 3**, или любой спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, описанный в данном документе, и (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA1 из **Таблицы 4**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgD из **Таблицы 3**, или любой спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, описанный в данном документе.

[305] Последовательности CH1 и CH2 IgA1, которые могут быть присоединены к N- и/или C-концам последовательностей спейсера CAR, полученным из IgA1, из **Таблицы 3** или любого спейсера CAR, полученного из шарнира IgA1, описанного в данном документе, представлены в **Таблице 4**.

Таблица 4: IgA1. Необязательные N-концевые последовательности CH1 и C-концевые последовательности CH2 из CH1 и CH2

(последовательности из Uniprot P01876, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полноразмерный шарнир IgA1 SEQ ID NO: 2560)

CH1		CH2	
Длина	Последовательность	Длина	Последовательность
1	C	1	P
2	PC	2	PR
3	VPC	3	PRL
4	TVPC (SEQ ID NO:4526)	4	PRLS (SEQ ID NO:4528)
5	VTVPC (SEQ ID NO:4527)	5	PRLSL (SEQ ID NO:4529)

[306] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, по настоящему изобретению содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2713. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2713.

[307] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, описанной в **Таблице 5**

Таблица 5: Спейсеры, полученные из IgA2

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
10	2713	9	2714-2715
8	2716-2718	7	2719-2722

[308] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 5** или где-либо в описании, дополнительно содержащую N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA2 из **Таблицы 6**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgA2 из **Таблицы 5** или описанной где-либо в описании.

[309] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 5** или где-либо в описании, дополнительно содержащую C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA2 из **Таблицы 6**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgA2 из **Таблицы 5** или описанной где-либо в описании.

[310] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 5** или где-либо в описании, дополнительно содержащую (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA2 из **Таблицы 6**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgA2 из **Таблицы 5** или описанной где-либо в описании, и (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA2 из **Таблицы 6**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgA2 из **Таблицы 5** или описанной где-либо в описании.

[311] Последовательности CH1 и CH2 IgA2, которые могут быть присоединены к N- и/или C-концам последовательностей спейсера CAR, полученных из IgA2, из **Таблицы 5** или приведенные где-либо в описании, представлены в **Таблице 6**.

[312] В некоторых аспектах N-концевой пролин полноразмерного шарнира IgA2 SEQ ID NO: 2713 может быть заменен аргинином (см., например, Uniprot P01877). Соответственно, в некоторых аспектах полноразмерный шарнир IgA2, описанный в данном документе, имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4530.

Таблица 6: IgA2. Необязательные N-концевые последовательности CH1 и C-концевые последовательности CH2 из CH1 и CH2

(последовательности из Uniprot P01877, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полноразмерный шарнир IgA2 SEQ ID NO: 2713)

CH1		CH2	
Длина	Последовательности	Длина	Последовательности
1	C	1	R

2	PC	2	PR
3	VPC	3	PRL
4	TVPC (SEQ ID NO:4526)	4	PRLS(SEQ ID NO:2528)
5	VTVPC (SEQ ID NO:4527)	5	PRLSL(SEQ ID NO:4529)

[313] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4848.

[314] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4849.

[315] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4850.

[316] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4851.

II.C. Спейсер CAR, полученный из шарнира IgG

[317] Из пяти изотипов иммуноглобулинов иммуноглобулин G (IgG) наиболее распространен в сыворотке крови человека. Четыре подкласса, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, которые являются высококонсервативными, различаются по своей константной области, особенно по их шарнирам и верхним доменам CH2. Эти области участвуют в связывании как с IgG-Fc-рецепторами (FcγR), так и с C1q. В результате различные подклассы имеют различные эффекторные функции, как в отношении стимуляции FcγR-экспрессирующих клеток, что приводит к фагоцитозу или антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, так и активации комплемента.

[318] Шарнирный экзон IgG1 включает очень гибкий шарнир (SEQ ID NO:2723).

IgG2 имеет более короткий шарнир, чем IgG1 (SEQ ID NO:2768). Нижняя шарнирная область IgG2 (фактически кодируемая областью CH2) также имеет делецию одной аминокислоты (отсутствует один из двойных глицинов, обнаруженных в положении 235-6 нижнего шарнира IgG1), в результате чего IgG2 имеет самый короткий шарнир из всех подклассов IgG. Кроме того, шарниры IgG2 еще более жесткие из-за полипролиновой спирали, стабилизированной до четырех (за некоторыми исключениями, обсуждаемыми ниже) дополнительных дисульфидных мостиков между тяжелыми цепями. Эти свойства ограничивают гибкость молекулы IgG2. Точно так же шарнирная область IgG4 (SEQ ID NO: 4453) также короче, чем шарнирная область IgG1. Гибкость шарнирной области IgG4 является промежуточной между гибкостью IgG1 и IgG2. В отличие от шарнира IgG2, шарнир IgG4 содержит двойные глицины, обнаруженные в положении 235-6 нижнего шарнира IgG1.

[319] IgG3 имеет гораздо более длинную шарнирную область, чем любой другой подкласс IgG или изотип Ig человека, то есть примерно в четыре раза длиннее шарнирной области IgG1, содержащую до 62 аминокислот (включая 21 пролин и 11 цистеинов), образуя полипролиновую спираль с ограниченной гибкостью (SEQ ID NO:2813). Точная длина шарнира варьирует между аллотипами IgG3, которые, по-видимому, претерпели гораздо больше эволюционных изменений, чем другие подклассы. В IgG3 фрагменты Fab находятся относительно далеко от фрагмента Fc, что придает молекуле более высокую гибкость. Этот длинный шарнир IgG3 является результатом дупликации шарнирного экзона, который кодируется одним экзоном в IgG1, IgG2 и IgG4, но достигает четырех экзонов в IgG3. Один из этих экзонов является общим для всех аллотипов IgG3, но он также имеет 1-3 копии гомологичного экзона шарнира IgG3 второго типа. Удлиненный шарнир в IgG3 также отвечает за его более высокую молекулярную массу по сравнению с другими подклассами. Разница в гибкости шарнира влияет на относительную ориентацию и движение Fab-плеч и Fc-хвоста антитела IgG.

[320] В IgG2 наблюдались структурные изомеры шарнира в результате альтернативного образования дисульфидных связей между цистеинами в шарнирной области тяжелых цепей и теми, которые участвуют в образовании дисульфидных связей между легкой и тяжелой цепью. Эти изомеры были обнаружены, в частности, в антителах IgG2 с легкими каппа-цепями, но в значительно меньшей степени для легких лямбда-цепей. Основными формами являются классическая форма А с четырьмя дисульфидными мостиками между двумя тяжелыми цепями IgG2 и форма В, в которой один шарнирный цистеин образует дисульфидную связь с легкой цепью. Однако существуют и другие конфигурации, поскольку эти изоформы, по-видимому, образуются независимо друг от друга, что приводит к появлению изоформ А/А, В/В, а также А/В.

[321] Сосуществуют два изомера IgG4, отличающиеся дисульфидной связью цистеинов шарнира. Центральный шарнир IgG образован мотивом CXXC, также обнаруженным в окислительно-восстановительных белках, таких как тиоредоксины. По сравнению с IgG1 с относительно жестким мотивом CPPC (SEQ ID NO: 4531),

внутрицепочечные дисульфидные связи легче образуются между этими цистеинами, обнаруженными в положениях 226 и 229 в IgG4, который имеет центральный шарнир CPSC (SEQ ID NO: 4532). Результатом является наблюдаемое количество нековалентно связанных полумолекул (состоящих из одной тяжелой и одной легкой цепи, HL, в отличие от классической конфигурации H₂L₂) в дополнение к ковалентно связанным межцепочечным изомерам. Мутант S228P IgG4, таким образом, с центральным шарниром IgG1, не образует полумолекулы, что согласуется с установлением того, что эта молекула не встречается в IgG1.

[322] В контексте данного документа термин «шарнир IgG1» относится к центральному плюс верхнему шарниру IgG1, т. е. последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2723. В некоторых аспектах шарнир IgG1 также содержит нижний шарнир (SEQ ID NO:4533) или его подпоследовательность. В некоторых аспектах последовательность нижнего шарнира IgG1, присоединенная к С-концу шарнира IgG1 SEQ ID NO: 2723, или его N-концевое укорочение (т. е. фрагмент SEQ ID NO: 2723, в котором один или более аминокислотные остатки были удалены из его N-концевой области) выбрана из группы, состоящей из A, AP, APE, APEL (SEQ ID NO: 4534), APELL (SEQ ID NO:4535), APELLG (SEQ ID NO:4536), APELLGG (SEQ ID NO:4537), и APELLGGP (SEQ ID NO:4533).

[323] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2723 или SEQ ID NO: 4839. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2723.

[324] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG1, способен индуцировать повышение уровня интерферона-γ, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[325] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG1, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150%

по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[326] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из IgG1, способен индуцировать повышенный уровень TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[327] В некоторых аспектах спейсер, полученный из шарнира IgG1, не представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2723. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2723, но не является SEQ ID NO: 2723.

[328] В контексте данного документа термин «спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1» включает, например, спейсер, содержащий шарнир IgG1 SEQ ID NO: 2723 (верхний шарнир плюс центральный шарнир), шарнир IgG1 SEQ ID NO: 4538 (верхний шарнир, центральный шарнир и нижний шарнир), их фрагменты и их варианты, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более дополнительных аминокислот области CH1 и/или области CH2. В некоторых аспектах термин «спейсер CAR, полученный из IgG1» относится к подпоследовательности шарнира IgG1 SEQ ID NO: 4538 (верхний шарнир, центральный шарнир и нижний шарнир), где подпоследовательность включает 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 последовательные аминокислоты из полипептидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4538.

[329] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, описанной в **Таблице 7**.

Таблица 7: Спейсеры, полученные из IgG1

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
15	2723	14	2724-2725	13	2726-2728
12	2729-2732	11	2733-2737	10	2738-2743
9	2744-2750	8	2751-2758	7	2759-2767

[330] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ

ID NO: 4840.

[331] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4839.

[332] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4843.

[333] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 7** или где-либо в описании, дополнительно содержащую N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG1 из **Таблицы 8**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG1 из **Таблицы 7** или приведенной где-либо в описании.

[334] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 7** или где-либо в описании, дополнительно содержащую C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG1 из **Таблицы 8**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgG1 из **Таблицы 7** или приведенной где-либо в описании.

[335] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 7** или где-либо в описании, дополнительно содержащую (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG1 из **Таблицы 8**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG1 из **Таблицы 7** или приведенной где-либо в описании, и (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG1 из **Таблицы 8**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgG1 из **Таблицы 7** или приведенной где-либо в описании.

[336] Последовательности CH1 и CH2 IgG1, которые могут быть присоединены к N- и/или C-концам последовательностей спейсера CAR, полученных из шарнира IgG1, из **Таблицы 7** или приведенные где-либо в описании, представлены в **Таблице 8**.

Таблица 8: IgG1. Необязательные N-концевые последовательности CH1 и C-

концевые последовательности CH2 из CH1 и CH2 (последовательности из Uniprot P01857, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полный шарнир IgG1 SEQ ID NO:2723)

CH1		CH2	
Длина	Последовательности	Длина	Последовательности
1	V	1	A
2	KV	2	AP
3	KKV	3	APE
4	DKKV (SEQ ID NO:4539)	4	APEL (SEQ ID NO:4534)
5	VDKKV (SEQ ID NO: 4540)	5	APELL (SEQ ID NO:4535)

[337] В контексте данного документа термин «шарнир IgG2» относится к центральному плюс верхнему шарниру IgG2, т. е. последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2768. В некоторых аспектах шарнир IgG2 также содержит нижний шарнир, т. е. последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4453, или ее подпоследовательность. В некоторых аспектах последовательность нижнего шарнира IgG2, присоединенная к С-концу шарнира IgG2 SEQ ID NO: 2768, или его N-концевое укорочение (т. е. фрагмент SEQ ID NO: 2768, в котором один или более аминокислотные остатки были удалены из его N-концевой области) выбрана из группы, состоящей из A, AP, APE, APEL (SEQ ID NO: 4534), APELL (SEQ ID NO:4535), APELLG (SEQ ID NO:4536), APELLGG (SEQ ID NO:4537), и APELLGGP (SEQ ID NO:4533).

[338] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2768. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2768.

[339] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG2, способен индуцировать повышение уровня интерферона- γ , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[340] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG2, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по

меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[341] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из IgG2, способен индуцировать повышенный уровень TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[342] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2768, но не являющейся SEQ ID NO: 4985.

[343] В некоторых аспектах термин «спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2» относится, например, к спейсеру, содержащему шарнир IgG2 человека SEQ ID NO: 2768 (верхний плюс центральный шарнир), шарнир IgG2 человека SEQ ID NO: 4541 (верхний шарнир, центральный шарнир и нижний шарнир), их фрагменты и их варианты, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более дополнительных аминокислот области CH1 и/или области CH2. В некоторых аспектах термин «спейсер CAR, полученный из IgG2» относится к подпоследовательности шарнира человеческого IgG2 SEQ ID NO: 4541 (верхний шарнир, центральный шарнир и нижний шарнир), где указанная подпоследовательность включает 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 последовательных аминокислот из полипептидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4541.

[344] В некоторых аспектах «спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2» по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, описанной в **Таблице 9А**.

Таблица 9А: Спейсеры, полученные из IgG2 человека

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
11	2768	10	2769-2770	9	2771-2773
8	2774-2777	7	2778-2782		

[345] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по

меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4842.

[346] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2768.

[347] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG2 человека, описанный в данном документе, способен индуцировать повышение уровня интерферона- γ , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[348] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG2, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911). В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2, не представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4986.

[349] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из IgG2, способен индуцировать повышенный уровень TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[350] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 человека, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 9А** или где-либо в описании, дополнительно содержащую N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена CH1 IgG2 из **Таблицы 10А**,

ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG2 из **Таблицы 9А** или описанной где-либо в описании.

[351] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 человека, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 9А** или где-либо в описании, дополнительно содержащую С-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2 из **Таблицы 10А**, ковалентно связанную с С-концом последовательности IgG2 из **Таблицы 9А** или приведенной где-либо в описании.

[352] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 человека, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 9А** или где-либо в описании, дополнительно содержащую (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена CH1 IgG2 из **Таблицы 10А**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG2 из **Таблицы 9А** или приведенной где-либо в описании, и (ii) С-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2 из **Таблицы 10А**, ковалентно связанную с С-концом последовательности IgG2 из **Таблицы 9А** или приведенной где-либо в описании.

[353] Последовательности CH1 и CH2 IgG2, которые могут быть присоединены к N- и/или С-концам последовательностей спейсера CAR, полученных из шарнира IgG2, в **Таблице 9А**, представлены в **Таблице 10А**.

Таблица 10А: IgG2 человека. Необязательные N-концевые последовательности CH1 и С-концевые последовательности CH2 из CH1 и CH2 (последовательности из Uniprot P01859, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полный шарнир IgG2 SEQ ID NO:2768)

CH1		CH2	
Длина	Последовательность	Длина	Последовательность
1	V	1	P
2	TV	2	ПА
3	KTV	3	PAP
4	DKTV (SEQ ID NO:4542)	4	PAPP (SEQ ID NO:4544)
5	KDKTV (SEQ ID NO:4543)	5	PAPPV (SEQ ID NO:4545)

[354] В некоторых аспектах термин «спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2» относится, например, к спейсеру, содержащему шарнир IgG2 мыши SEQ ID NO: 4926 (верхний плюс центральный шарнир), шарнир IgG2 мыши SEQ ID NO: 4992 (верхний шарнир, центральный шарнир и нижний шарнир), их фрагменты и их варианты, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более дополнительных аминокислот области CH1 и/или области CH2. В некоторых аспектах термин «спейсер CAR, полученный из IgG2» относится к подпоследовательности шарнира IgG2 мыши SEQ ID NO: 4992 (верхний шарнир, центральный шарнир и нижний шарнир), где указанная подпоследовательность

включает 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 последовательных аминокислот из полипептидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4992.

[355] В некоторых аспектах «спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2» по настоящему изобретению представляет собой «спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши», содержащий, состоящий или по существу состоящий из последовательности, описанной в **Таблице 9В**.

Таблица 9В: Спейсеры CAR, полученные из шарнира IgG2A мыши

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
16	4926	15	4927-4928	14	4929-4931
13	4932-4935	12	4936-4940	11	4941-4946
10	4947-4953	9	4954-4961	8	4962-4970
7	4971-4980				

[356] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4830. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4831. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4832.

[357] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4830. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4831. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4832.

[358] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, описанный в данном документе, способен индуцировать повышение уровня интерферона- γ , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[359] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, раскрытый в данном документе, способен индуцировать повышенный уровень интерлейкина-2, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911). В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, не представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4986.

[360] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер CAR, полученный из IgG2 мыши, способен индуцировать повышенный уровень TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[361] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 9В** или где-либо в описании, дополнительно содержащую N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG2 из **Таблицы 10В**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG2 из **Таблицы 9В** или описанной где-либо в описании.

[362] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 9В** или где-либо в описании, дополнительно содержащую C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2 из **Таблицы 10В**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgG2 из **Таблицы 9В** или приведенной где-либо в описании.

[363] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2 мыши, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 9В** или

где-либо в описании, дополнительно содержащую (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG2 из **Таблицы 10В**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG2 из **Таблицы 9В** или приведенной где-либо в описании, и (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2 из **Таблицы 10В**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgG2 из **Таблицы 9В** или приведенной где-либо в описании.

[364] Последовательности CH1 и CH2 IgG2, которые могут быть присоединены к N- и/или C-концам последовательностей спейсера CAR, полученных из шарнира IgG2, в **Таблице 9В**, представлены в **Таблице 10В**.

Таблица 10В: IgG2A мыши. Необязательные N-концевые последовательности CH1 и C-концевые последовательности CH2 из CH1 и CH2 (последовательности из Uniprot P01865, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полный шарнир IgG2A мыши SEQ ID NO:4926)

CH1		CH2	
Длина	Последовательность	Длина	Последовательность
1	I	1	A
2	KI	2	AP
3	KKI	3	APN
4	DKKI (SEQ ID NO:4981)	4	APNL (SEQ ID NO:4983)
5	VDKKI (SEQ ID NO:4982)	5	APNLL (SEQ ID NO:4984)

[365] В контексте данного документа термин «шарнир IgG3» относится к центральному плюс верхнему шарниру IgG3, т. е. последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2813. В некоторых аспектах шарнир IgG3 также содержит нижний шарнир (APELLGGP; SEQ ID NO: 4533).

[366] Длинный шарнир IgG3 является результатом дубликации шарнирного экзона, который кодируется одним экзоном в IgG1, IgG2 и IgG4, но достигает четырех экзонов в IgG3. Один из этих экзонов является общим для всех аллотипов IgG3, но он также имеет 1-3 копии гомологичного экзона шарнира IgG3 второго типа. В зависимости от количества повторов последовательности шарнирная область может варьироваться от 27 до 83 аминокислотных остатков между различными аллотипами IgG3 (см. **Фиг. 6**). Как показано на **Фиг. 6**, различные идентифицированные аллотипы IgG3 включают шарнир с паттерном, соответствующим a, ab, abb или abbb, где «a» представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3848, а «b» представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3958. В некоторых аспектах последовательность «b» представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4546 (человеческий вариант), SEQ ID NO:4547 (Pan troglodytes), SEQ ID NO: 4548 (Pan troglodytes), SEQ ID NO:4549 (Pongo pygmaeus), SEQ ID NO:4550 (Gorilla gorilla), или SEQ ID NO: 4551 (Pongo abelii).

[367] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2813.

[368] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG3, способен индуцировать повышение уровня интерферона- γ , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[369] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG3, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[370] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из IgG3, способен индуцировать повышенный уровень TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[371] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, не является SEQ ID NO:2813.

[372] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2813.

[373] В контексте данного документа термин «спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3» включает, например, спейсер, содержащий шарнир IgG3 SEQ ID NO: 2813 (верхний шарнир плюс центральный шарнир), шарнир IgG3 SEQ ID NO: 4552 (верхний шарнир, центральный шарнир и нижний шарнир), их фрагменты и их варианты,

содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более дополнительных аминокислот области СН1 и/или области СН2.

[374] В некоторых аспектах описанный спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, содержит одну или более мутаций, в результате которых заменяется треонин (Т) в подпоследовательности, указанной в SEQ ID NO:4553. Эти треонины подвержены гликозилированию, а также являются субстратами для трипсина и протеиназы К. Соответственно, их замена может снижать иммуногенность, вызываемую спейсером CAR, и повышать устойчивость к протеазам, тем самым улучшая стабильность CAR in vivo.

[375] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, описанной в **Таблице 11**.

Таблица 11: Спейсеры, полученные из IgG3

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
62	2813	61	2814-2815	60	2816-2818
59	2819-2822	58	2823-2827	57	2828-2833
56	2834-2840	55	2841-2848	54	2849-2857
53	2858-2867	52	2868-2878	51	2879-2890
50	2891-2903	49	2904-2917	48	2918-2932
47	2933-2948	46	2949-2965	45	2966-2983
44	2984-3002	43	3003-3022	42	3023-3043
41	3044-3065	40	3066-3088	39	3089-3112
38	3113-3137	37	3138-3163	36	3164-3190
35	3191-3218	34	3219-3247	33	3248-3277
32	3278-3308	31	3309-3340	30	3341-3373
29	3374-3407	28	3408-3442	27	3443-3478
26	3479-3515	25	3516-3553	24	3554-3592
23	3593-3632	22	3633-3673	21	3674-3715
20	3716-3758	19	3759-3802	18	3803-3847
17	3848-3893	16	3894-3940	15	3941-3988
14	3989-4037	13	4038-4087	12	4088-4138
11	4139-4190	10	4191-4243	9	4244-4297
8	4298-4352	7	4755-4810		

[376] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4838.

[383] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4841.

[384] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 11** или где-либо в описании, дополнительно содержащую N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG3 из **Таблицы 12**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG3 из **Таблицы 11** или приведенной где-либо в описании.

[385] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 11** или где-либо в описании, дополнительно содержащую C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG3 из **Таблицы 12**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgG3 из **Таблицы 11** или приведенной где-либо в описании.

[386] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 11** или где-либо в описании, дополнительно содержащую (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG3 из **Таблицы 12**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG3 из **Таблицы 11** или приведенной где-либо в описании, и (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG3 из **Таблицы 12**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgG3 из **Таблицы 11** или приведенной где-либо в описании.

[387] Последовательности CH1 и CH2 IgG3, которые могут быть присоединены к N- и/или C-концам последовательностей спейсера CAR, полученных из шарнира IgG3, из **Таблицы 11** или приведенных где-либо в описании, представлены в **Таблице 12**.

Таблица 12: IgG3. Необязательные N-концевые последовательности CH1 и C-концевые последовательности CH2 из CH1 и CH2 (последовательности из Uniprot P01860, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полный шарнир IgG3 SEQ ID

NO:2813)

CH1		CH2	
Длина	Последовательности	Длина	Последовательности
1	V	1	A
2	RV	2	AP
3	KRV	3	APE
4	DKRV (SEQ ID NO:4554)	4	APEL (SEQ ID NO:4534)
5	VDKRV (SEQ ID NO:4555)	5	APELL (SEQ ID NO:4535)

[388] В контексте данного документа термин «шарнир IgG4» относится к центральному плюс верхнему шарниру IgG4, т. е. последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4353. В некоторых аспектах шарнир IgG4 также содержит нижний шарнир (APEFLGGP; SEQ ID NO: 4556) или его подпоследовательность. В некоторых аспектах последовательность нижнего шарнира IgG4, присоединенная к С-концу шарнира IgG4 SEQ ID NO: 4353, или его N-концевое укорочение (т. е. фрагмент SEQ ID NO: 4353, в котором один или более аминокислотные остатки были удалены из его N-концевой области) выбрана из группы, состоящей из A, AP, APE, APEF (SEQ ID NO: 4557), APEFL (SEQ ID NO:4558), APEFLG (SEQ ID NO:4559), APEFLGG (SEQ ID NO:4560), и APEFLGGP (SEQ ID NO:4556).

[389] В контексте данного документа термин «спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4» включает, например, спейсер, содержащий шарнир IgG4 SEQ ID NO: 4353 (верхний шарнир плюс центральный шарнир), шарнир IgG4 SEQ ID NO: 4561 (верхний шарнир, центральный шарнир и нижний шарнир), их фрагменты и их варианты, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более дополнительных аминокислот области CH1 и/или области CH2. В некоторых аспектах термин «спейсер CAR, полученный из IgG4» относится к подпоследовательности шарнира IgG4 SEQ ID NO: 4561 (верхний шарнир, центральный шарнир и нижний шарнир), где подпоследовательность включает 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 последовательные аминокислоты из полипептидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4561.

[390] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4353. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4353.

[391] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG4, способен индуцировать повышение уровня интерферона- γ , например, на по

меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[392] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgG4, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[393] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, не является SEQ ID NO:4987. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, не является SEQ ID NO:4988. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, не является SEQ ID NO:4989. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, не является SEQ ID NO:4990. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, не является SEQ ID NO:4991.

[394] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, описанной в **Таблице 13**.

Таблица 13: Спейсеры, полученные из IgG4

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
9	4353	11	4354-4355	10	4356-4358
8	4359-4362	8	4363-4367	7	4368-4373

[395] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 13** или где-либо в описании, дополнительно содержащую N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG4 из **Таблицы 14**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG4 из **Таблицы 13** или приведенной где-либо в описании. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 13** или где-либо в описании, дополнительно содержащую C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG4 из **Таблицы 14**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgG4 из **Таблицы 13** или приведенной где-либо в описании.

[396] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG4, по

настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 13** или где-либо в описании, дополнительно содержащую (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG4 из **Таблицы 14**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgG4 из **Таблицы 13** или приведенной где-либо в описании, и (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG4 из **Таблицы 14**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgG4 из **Таблицы 13** или приведенной где-либо в описании.

[397] Последовательности CH1 и CH2 IgG4, которые могут быть присоединены к N- и/или C-концам последовательностей спейсера CAR, полученных из шарнира IgG4, из **Таблицы 13** или приведенные где-либо в описании, представлены в **Таблице 14**.

Таблица 14: IgG4. Необязательные N-концевые последовательности CH1 и C-концевые последовательности CH2 из CH1 и CH2 (последовательности из Uniprot P01861, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полный шарнир IgG4 SEQ ID NO:4353).

CH1		CH2	
Длина	Последовательность	Длина	Последовательность
1	V	1	A
2	RV	2	AP
3	KRV	3	APE
4	DKRV (SEQ ID NO:4554)	4	APEF (SEQ ID NO:4557)
5	VDKRV (SEQ ID NO:4555)	5	APEFL (SEQ ID NO:4558)

II.D. Спейсер CAR, полученный из шарнира IgE

[398] Иммуноглобулин E (IgE) представляет собой изотип иммуноглобулина (Ig), состоящий из двух тяжелых цепей (ϵ -цепи) и двух легких цепей, причем ϵ -цепь содержит 4 Ig-подобных константных домена (C ϵ 1-C ϵ 4). IgE уникален тем, что в нем отсутствует настоящая шарнирная область, и он заменяется доменом C ϵ 2.

[399] В контексте данного термин «шарнир IgE» относится к последовательности, расположенной между C-концом C ϵ 1 и N-концом C ϵ 2, то есть к последовательности, расположенной между аминокислотами 241 и 260. Соответственно, как определено в данном документе, полноразмерный «шарнир IgE» будет соответствовать последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4374.

[400] В контексте данного документа термин «спейсер CAR, полученный из шарнира IgE» включает, например, спейсер, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4374, его фрагменты и их варианты, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более дополнительных аминокислот области C ϵ 1 и/или области C ϵ 2.

[401] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgE, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4374. В некоторых аспектах спейсер CAR,

полученный из шарнира IgE, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4374.

[402] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgE, способен индуцировать повышение уровня интерферона- γ , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[403] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgE, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[404] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgE, описанный в данном документе, способен индуцировать повышение уровня TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[405] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgE по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, описанной в **Таблице 15**.

Таблица 15: Спейсеры, полученные из IgE

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
19	4374	18	4375-4376	17	4377-4379
16	4380-4383	15	4384-4388	14	4389-4394
13	4395-4401	12	4402-4409	11	4410-4418
10	4419-4428	9	4429-4439	8	4440-4451

7	4452-4464				
---	-----------	--	--	--	--

[406] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgE, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4856.

[407] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgE, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 15** или где-либо в описании, дополнительно содержащую N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена Cε1 IgE из **Таблицы 16**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgE из **Таблицы 15** или приведенной где-либо в описании.

[408] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgE, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 15** или где-либо в описании, дополнительно содержащую C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена Cε2 IgE из **Таблицы 16**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgE из **Таблицы 15** или приведенной где-либо в описании.

[409] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgE, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 15** или где-либо в описании, дополнительно содержащую (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена Cε1 IgE из **Таблицы 16**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgE из **Таблицы 15** или приведенной где-либо в описании, и (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена Cε2 IgE из **Таблицы 16**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgE из **Таблицы 15** или приведенной где-либо в описании.

[410] Последовательности Cε1 и Cε2 IgE, которые могут быть присоединены к N-и/или C-концам последовательностей спейсера CAR, полученных из шарнира IgE, из **Таблицы 15** или приведенных где-либо в описании, представлены в **Таблице 16**.

Таблица 16: IgE. Необязательные N-концевые последовательности Cε1 и C-концевые последовательности Cε2 из Cε1 и Cε2 (последовательности из Uniprot P01854, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полный шарнир IgE SEQ ID NO:4374).

Cε1		Cε2	
Длина	Последовательности	Длина	Последовательности
1	D	1	K
2	TD	2	KI

3	STD	3	KIL
4	SSTD (SEQ ID NO:4562)	4	KILQ (SEQ ID NO:4564)
5	PSSTD (SEQ ID NO:4563)	5	KILQS (SEQ ID NO:4565)

[411] Для простоты область Cε1 IgE считается областью CH1, а область IgE Cε2 считается областью CH2. Соответственно, ссылки на CH1 IgM в описании относятся к Cε1 IgE. Аналогично, ссылки на CH2 IgE в описании относятся к Cε2 IgE.

II.E. Спейсер CAR, полученный из шарнира IgM

[412] Иммуноглобулин M (IgM) представляет собой самое большое антитело, и это первое антитело, которое появляется в ответ на первоначальное воздействие антигена. IgM включает легкие цепи и тяжелые цепи. Легкая цепь (λ или κ) представляет собой белок примерно из 220 аминокислот, состоящий из переменного домена VL (сегмент из около 110 аминокислот) и константного домена CL (также длиной около 110 аминокислот). Тяжелая цепь μ IgM представляет собой белок из ~576 аминокислот и включает переменный домен (VH ~110 аминокислот), четыре отдельных домена константной области (Cμ1, Cμ2, Cμ3, Cμ4, каждый ~110 аминокислот) и «хвостик» из ~20 аминокислот. Cμ1 и Cμ2 соединены последовательностью соединителей, указанной в SEQ ID NO:4727.

[413] Для целей настоящего изобретения термин «шарнир IgM» определяется как удлиненная последовательность, окружающая соединитель Cμ1-Cμ2. Соответственно, как определено в данном документе, полноразмерный «шарнир IgM» по настоящему изобретению будет соответствовать последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4465.

[414] В контексте данного документа термин «спейсер CAR, полученный из шарнира IgM» включает, например, спейсер, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4465, его фрагменты и их варианты, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более дополнительных аминокислот области Cμ1 и/или области Cμ1. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, представляет собой соединитель Cμ1-Cμ2, имеющий последовательность, указанную в SEQ ID NO:4727.

[415] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, содержит по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4465. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4465.

[416] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgM, способен индуцировать повышение уровня интерферона-γ, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере

около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[417] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgM, способен индуцировать повышение уровня интерлейкина-2, например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[418] В некоторых аспектах CAR, содержащий спейсер, полученный из шарнира IgM, способен индуцировать повышение уровня TNF- α , например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 150% по сравнению с CAR, содержащим эталонный спейсер, например, эталонный спейсер IgG4 (например, спейсер SEQ ID NO: 4911).

[419] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, описанной в **Таблице 17**.

Таблица 17: Спейсеры, полученные из IgM

Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID	Длина	SEQ ID
26	4465	25	2783-2784	24	2785-2787
23	2788-2791	22	2792-2796	21	2797-2802
20	2803-2809	19	2810-2812, 4566-4570	18	4571-4579
17	4580-4589	16	4590-4600	15	4601-4612
14	4613-4625	13	4626-4639	12	4640-4654
11	4655-4670	10	4671-4687	9	4688-4705
8	4706-4724	7	4725-4744		

[420] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или

около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4857; SEQ ID NO: 4858; SEQ ID NO: 4859; и любой их комбинации.

[421] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4857.

[422] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4858.

[423] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4859.

[424] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 17** или где-либо в описании, дополнительно содержащую N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена C ϵ 1 IgM из **Таблицы 18**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgM из **Таблицы 17** или приведенной где-либо в описании.

[425] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 17** или где-либо в описании, дополнительно содержащую C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена C μ 2 IgM из **Таблицы 18**, ковалентно связанную с N-концом последовательности IgM из **Таблицы 17** или приведенной где-либо в описании.

[426] В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, по настоящему изобретению содержит последовательность, описанную в **Таблице 17** или где-либо в описании, дополнительно содержащую (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена C μ 1 IgN из **Таблицы 18**,

ковалентно связанную с N-концом последовательности IgM из **Таблицы 17** или приведенной где-либо в описании, и (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена C μ 2 IgM из **Таблицы 18**, ковалентно связанную с C-концом последовательности IgM из **Таблицы 17** или приведенной где-либо в описании.

[427] Последовательности C μ 1 и C μ 2 IgM, которые могут быть присоединены к N-и/или C-концам последовательностей спейсера CAR, полученных из шарнира IgM, из **Таблицы 17** или приведенных где-либо в описании, представлены в **Таблице 18**.

Таблица 18: IgM. Необязательные N-концевые последовательности C μ 1 и C-концевые последовательности C μ 2 из C μ 1 и C μ 2 (последовательности из Uniprot P01871, содержащие от 1 до 5 аминокислот, фланкирующих полный шарнир IgM SEQ ID NO:4465).

C μ 1		C μ 2	
Длина	Последовательности	Длина	Последовательности
1	V	1	R
2	NV	2	RK
3	KNV	3	RKS
4	EKNV (SEQ ID NO:4745)	4	RKSK (SEQ ID NO:4747)
5	KEKNV (SEQ ID NO:4746)	5	RKSKL (SEQ ID NO:4748)

[428] Для простоты область C μ 1 IgM считается областью CH1, а область C μ 2 IgM считается областью CH2. Соответственно, ссылки на CH1 IgM в описании относятся к C μ 1 IgM. Точно так же ссылки на CH2 IgM в описании относятся к C μ 2 IgM.

[429] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность, указанную в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9A, 9B, 11, 13, 15, 17, или их комбинацию. В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность, указанную в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9A, 9B, 11, 13, 15, 17, или их комбинацию, и дополнительно содержит N-концевую последовательность, указанную в Таблицах 2, 4, 6, 8, 10A, 10B, 12, 14, 16, 18, или их комбинацию. В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность, указанную в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9A, 9B, 11, 13, 15, 17, или их комбинацию, и дополнительно содержит C-концевые последовательности, указанные в Таблицах 2, 4, 6, 8, 10A, 10B, 12, 14, 16, 18, или их комбинации. В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность, указанную в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9A, 9B, 11, 13, 15, 17, или их комбинацию, и дополнительно содержит (i) N-концевую последовательность, указанную в Таблицах 2, 4, 6, 8, 10A, 10B, 12, 14, 16, 18, или их комбинацию, и (ii) C-концевую последовательность, указанную в Таблицах 2, 4, 6, 8, 10A, 10B, 12, 14, 16, 18 или их комбинацию.

[430] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину в 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32,

33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, или 400 аминокислот.

[431] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину менее около 400, менее около 390, менее около 385, менее около 380, менее около 375, менее около 370, менее около 365, менее около 360, менее около 355, менее около 350, менее около 345, менее около 340, менее около 335, менее около 330, менее около 325, менее около 320, менее около 315, менее около 310, менее около 305, менее около 300, менее около 295, менее около 290, менее около 285, менее около 280, менее около 275, менее около 270, менее около 265, менее около 260, менее около 255, менее около 250, менее около 245, менее около 240, менее около 235, менее около 230, менее около 225, менее около 220, менее около 215, менее около 210, менее около 205, менее около 200, менее около 195, менее около 190, менее около 185, менее около 180, менее около 175, менее около 170, менее около 165, менее около 160, менее около 155, менее около 150, менее около 145, менее около 140, менее около 135, менее около 130, менее около 125, менее около 120, менее около 115, менее около 110, менее около 105, менее около 100, менее около 95, менее около 90, менее около 85, менее около 80, менее около 75, менее около 70, менее около 65, менее около 60, менее около 55, менее около 50, менее около 45, менее около 40, менее около 35, менее около 30, менее около 25, менее около 20, менее около 15, менее около 10 или менее около 5 аминокислот.

[432] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину в диапазоне от 4 до 8, от 4 до 9, от 4 до 10, от 5 до 8, от 5 до 9, от 5 до 10, от 4 до 12, от 4 до 13, от 4 до 14, от 4 до 15, от 4 до 16, от 5 до 14, от 5 до 15, от 5 до 16, от 6 до 12, от 6 до 13, от 6 до 14, от 6 до 15, от 6 до 16, от 7 до 9, от 7 до 10, от 7 до 11, от 7 до 12, от 7 до 13,

от 7 до 14, от 7 до 15, от 7 до 16, от 10 до 15, от 15 до 20, от 20 до 25, от 25 до 30, от 30 до 35, от 35 до 40, от 40 до 45, от 45 до 50, от 50 до 55, от 55 до 60, от 60 до 65, от 65 до 70, от 70 до 75, от 75 до 80, от 80 до 85, от 85 до 90, от 90 до 95, от 95 до 100, от 100 до 105, от 105 до 110, от 110 до 115, от 115 до 120, от 120 до 125, от 125 до 130, от 130 до 135, от 135 до 140, от 140 до 145, от 145 до 150, от 150 до 155, от 155 до 160, от 160 до 165, от 165 до 170, от 170 до 175, от 175 до 180, от 180 до 185, от 185 до 190, от 190 до 195, от 195 до 200 аминокислот.

[433] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину в диапазоне от около 400 до около 390, от 390 до около 380, от около 380 до около 370, от около 370 до около 360, от около 360 до около 350, от около 350 до около 340, от около 340 до около 330, от около 330 до около 320, от около 320 до около 310, от около 310 до около 300, от около 300 до около 290, от около 290 до около 280, от около 280 до около 270, от около 270 до около 260, от около 260 до около 250, от около 250 до около 240, от около 240 до около 230, от около 230 до около 220, от около 220 до около 210, от около 210 до около 200, от около 200 до около 190, от около 190 до около 180, от около 180 до около 170, от около 170 до около 160, от около 160 до около 150, от около 150 до около 140, от около 140 до около 130, от около 130 до около 120, от около 120 до около 110, от около 110 до около 100, от около 100 до около 90, от около 90 до около 80, от около 80 до около 70, от около 70 до около 60, от около 60 до около 50, от около 50 до около 40, от 40 до около 30, от около 30 до около 20 или от около 20 до около 10 аминокислот.

[434] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину в диапазоне от около 400 до около 380, от около 380 до около 360, от около 360 до около 340, от около 340 до около 320, от около 320 до около 300, от около 300 до около 280, от около 280 до около 260, от около 260 и около 240, от около 240 и около 220, от около 220 и около 200, от около 200 и около 180, от около 180 до около 160, от около 160 до около 140, от около 120 до около 100, от около 100 до около 80, от около 80 до около 60, от около 60 до около 40, от около 40 до 20, от около 20 до около 10 аминокислот в длину.

[435] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину в диапазоне от около 400 до около 350, от около 350 до около 300, от около 300 до около 250, от около 250 до 200, от около 200 до около 150, от около 150 до около 100, от 100 до около 50, от 50 до около 1 аминокислоты.

[436] В некоторых аспектах длина спейсера CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 400 до около 300, от около 300 до около 200, от около 200 до около 100 или от около 100 до около 1 аминокислоты.

[437] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению, например, спейсер CAR, описанный в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9A, 9B, 11, 13, 15 или 17, имеет длину около 5, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, около 90, около 95, около 100, около 105, около 110, около 115, около 120, около 125, около 130, около 135, около 140, около 145, около 150, около 155, около 160, около 165, около 170,

около 175, около 180, около 185, около 190, около 195, около 200, около 205, около 210, около 215, около 220, около 225, около 230, около 235, около 240, около 245 или около 250 ангстрем.

[438] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению, например, спейсер CAR, описанный в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17, имеет длину в диапазоне от около 5 до около 10, от около 10 до около 15, от около 15 до около 20, от около 20 до около 25, от около 25 до около 30, от около 30 до около 35, от около 35 до около 40, от около 40 до около 45, от около 45 до около 50, от около 50 до около 55, от около 55 до около 60, от около 60 до около 65, от около 65 до около 70, от около 70 до около 75, от около 75 до около 80, от около 80 до около 85, от около 85 до около 90, от около 90 до около 95, от около 95 до около 100, от около 100 до около 105, от около 105 до около 110, от около 110 до около 115, от около 115 до около 120, от около 120 до около 125, от около 125 до около 130, от около 130 до около 135, от около 135 до около 140, от около 140 до около 145, от около 145 до около 150, от около 150 до около 155, от около 155 до около 160, от около 160 до около 165, от около 165 до около 170, от около 170 до около 175, от около 175 до около 180, от около 180 до около 185, от около 185 до около 190, от около 190 до около 195, от около 195 до около 200, от около 200 до около 205, от около 205 до около 210, от около 210 до около 215, от около 215 до около 220, от около 220 до около 225, от около 225 до около 230, от около 230 до около 235, от около 235 до около 240, от около 240 до около 245 или от около 245 до около 250 ангстрем.

[439] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению, например, спейсер CAR, описанный в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17, имеет длину в диапазоне от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90, от около 90 до около 100, от около 100 до около 110, от около 110 до около 120, от около 120 до около 130, от около 130 до около 140, от около 140 до около 150, от около 150 до около 160, от около 160 до около 170, от около 170 до около 180, от около 180 до около 190, от около 190 до около 200, от около 200 до около 210, от около 210 до около 220, от около 220 до около 230, от около 230 до около 240, или от около 245 до около 250 ангстрем.

[440] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению, например, спейсер CAR, описанный в таблицах 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17, имеет длину в диапазоне от около 5 до около 25, от около 25 до около 50, от около 50 до около 75, от около 75 до около 100, от около 100 до около 125, от около 125 до около 150, от около 150 до около 175, от около 175 до около 200, от около 200 до около 225 или от около 225 до около 250 ангстрем.

[441] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению, например, спейсер CAR, описанный в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17, имеет длину менее около 250, менее около 240, менее около 230, менее около 220, менее около 210, менее около 200, менее около 190, менее около 180, менее около 170, менее около 160,

менее около 150, менее около 140, менее около 130, менее около 120, менее около 110, менее около 100, менее около 90, менее около 80, менее около 70, менее около 60, менее около 50, менее около 40, менее около 30, менее около 20 или менее около 10 ангстрем.

[442] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности с последовательностью, указанной в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17.

[443] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен относительно последовательности, указанной в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17. В некоторых аспектах аминокислоты цистеины заменены аланином. В некоторых аспектах все аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых аспектах по меньшей мере одна аминокислотная замена является консервативной. В некоторых аспектах по меньшей мере одна аминокислотная замена является неконсервативной.

[444] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность, указанную в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17, где N-концевая аминокислота представляет собой N-концевую аминокислоту природного шарнира, и где последовательность из Таблиц 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17 удлинена на один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот в соответствующую область СН1 (т. е. природную область СН1). Другими словами, полученный спейсер CAR по настоящему изобретению содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот с С-конца соответствующей области СН1 (например, области СН1 IgD для спейсера CAR, полученного из шарнира IgD), присоединенного к N-концу последовательности из Таблиц 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17.

[445] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность, указанную в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17, где С-концевая аминокислота представляет собой С-концевую аминокислоту природного шарнира, и где последовательность из Таблиц 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17 удлинена на один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот в соответствующую область СН2 (т. е. природную область СН2). Другими словами, полученный спейсер CAR содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот с N-конца соответствующей области СН2 (например, области СН2 IgD для спейсера CAR, полученного из шарнира IgD), присоединенного к С-концу последовательности из Таблиц 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17.

[446] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит

последовательность, указанную в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17, где (i) N-концевая аминокислота представляет собой N-концевую аминокислоту природного шарнира, а С-концевая аминокислота представляет собой С-концевую аминокислоту природного шарнира, и (ii) последовательность из Таблиц 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17, удлиняется на одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот в соответствующую область СН1 (т.е. природную область СН1) и удлиняется на одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот в соответствующую область СН2 (т. е. природную область СН2). Другими словами, полученный спейсер CAR содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот с С-конца соответствующей области СН1 (например, области СН1 IgD для спейсера CAR, полученного из шарнира IgD), присоединенной к N-концу последовательности из Таблиц 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17, и одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот с N-конца соответствующей области СН2 (например, области СН2 IgD для спейсера CAR, полученного из шарнира IgD), присоединенной к С-концу последовательности из Таблиц 1, 3, 5, 7, 9А, 9В, 11, 13, 15 или 17.

[447] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности, указанной на **Фиг. 9**. Таблица включает последовательности иллюстративных спейсеров по настоящему изобретению, их SEQ ID NO, длину (включая необязательный гибкий линкер), источник шарнира Ig, а также идентификатор (столбец «спейсер»), используемый для каждого шарнира на графических материалах и в разделе примеров данного описания.

[448] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности спейсера CAR, полученного из шарнира IgA1, например, спейсера 16 (SEQ ID NO: 4844), спейсера 17 (SEQ ID NO: 4845), спейсера 18 (SEQ ID NO: 4846) или спейсера 19 (SEQ ID NO: 4847), как показано на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA1, содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818.

[449] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности спейсера CAR, полученного из шарнира IgA2, например, спейсера 20 (SEQ ID NO: 4848), спейсера 21 (SEQ ID NO: 4849), спейсера 22 (SEQ ID NO: 4850) или спейсера 23 (SEQ ID NO: 4851), как показано на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgA2, содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[450] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности спейсера CAR, полученного из шарнира IgD, например, спейсера 24 (SEQ ID NO: 4852), спейсера 25 (SEQ ID NO: 4853), спейсера 26 (SEQ ID NO: 4854) или спейсера 27 (SEQ ID NO: 4855), как показано на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgD, содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[451] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности спейсера CAR, полученного из шарнира IgE, например, спейсера 28 (SEQ ID NO:4856), как показано на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgE, содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[452] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности спейсера CAR, полученного из шарнира IgG1, например, спейсера 11 (SEQ ID NO: 4840) или спейсера 10 (SEQ ID NO: 4839), как показано на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG1, содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[453] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности IgG2, например, полученного из шарнира IgG2 спейсера CAR, например, спейсера 14 (SEQ ID NO: 4842), как показано на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2, содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[454] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности шарнира IgG2, например, полученного из шарнира IgG2A мыши спейсера CAR, например, спейсера 1 (SEQ ID NO: 4830), спейсера 2 (SEQ ID NO:4831), спейсера 3 (SEQ ID NO:4832), как показано на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2, содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[455] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности шарнира IgG2, например, полученного из шарнира IgG2A мыши спейсера CAR, например, спейсера 1 (SEQ ID NO: 4830), спейсера 2 (SEQ ID NO:4831), спейсера 3 (SEQ ID NO:4832), как показано на **Фиг. 9**, где шарнир IgG2 представляет собой шарнирную область IgG2A (UniProt P01865). В некоторых аспектах спейсер CAR содержит 6-мерную, 7-мерную, 8-мерную, 9-мерную, 10-мерную, 11-мерную, 12-мерную или 13-мерную аминокислотную подпоследовательность шарнира IgG2A мыши с SEQ ID NO: 4860 (EPRGPTIKPCPPC). В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG2A мыши с SEQ ID NO: 4860, дополнительно содержит 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот CH1 из IgG2A мыше, расположенные выше от последовательности шарнира (т. е. последовательность VDKKI SEQ ID NO:4861 или ее подпоследовательности), и/или 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот CH2 из IgG2A мыши, расположенные ниже от последовательности шарнира (т.е. последовательности KCPAP с SEQ ID NO:4862 или его подпоследовательности). В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира мышинового IgG2A SEQ ID NO:4860, содержит подпоследовательность KPCPPC (SEQ ID NO:4863) из шарнира IgG2A и непрерывную подпоследовательность KPC области CH2 мышинового IgG2A, т.е. спейсер CAR имеет последовательность спейсера 1. В некоторых аспектах шарнир IgG2,

например, полученный из шарнира IgG2A мыши спейсер CAR содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[456] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности спейсера CAR, полученного из шарнира IgG3, например, спейсера 4 (SEQ ID NO: 4844), спейсера 5 (SEQ ID NO: 4834), спейсера 6 (SEQ ID NO: 4835), спейсера 7 (SEQ ID NO: 4836), спейсера 8 (SEQ ID NO: 4837), спейсера 9 (SEQ ID NO: 4838) или спейсера 13 (SEQ ID NO: 4841), как показано на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgG3, содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[457] В некоторых конкретных аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит, состоит или по существу состоит из последовательности спейсера CAR, полученного из шарнира IgM, например, спейсера 29 (SEQ ID NO:4857), спейсера 30 (SEQ ID NO:4858) или спейсера 31 (SEQ ID NO:4859), как показано на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR, полученный из шарнира IgM, содержит линкер Gly-Ser, например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[458] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с последовательностью, указанной на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность, идентичную любой из последовательностей, указанных на **Фиг. 9**, за исключением одной, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых аспектах аминокислотная замена включает по меньшей мере одну неконсервативную аминокислотную замену.

[459] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность любого из спейсеров SEQ ID NO: 4830-4859 (спейсер 1-31), описанных на **Фиг. 9**, при этом последовательность спейсера дополнительно содержит необязательный гибкий линкер (например, линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088, указанный на **Фиг. 9** и ее легенде). Таким образом, в некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность спейсера, описанную на **Фиг. 9**, и необязательный С-концевой или N-концевой гибкий линкер. Например, в некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4882, то есть спейсер 1 плюс С-концевой линкер SEQ ID NO: 4818; последовательность, указанную в SEQ ID NO:4883, т.е. спейсер 1 плюс N-концевой линкер SEQ ID NO:4818; или последовательность, указанную в SEQ ID NO:4884, т.е. спейсер 1 плюс как С-концевой линкер, так и N-концевой линкер SEQ ID NO:4818. Например, в некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит последовательность спейсера 1 плюс С-концевой линкер SEQ ID NO:5088;

последовательность спейсера 1 плюс N-концевой линкер SEQ ID NO:5088; или последовательность спейсера 1 плюс как С-концевой линкер, так и N-концевой линкер SEQ ID NO:5088. В некоторых аспектах любые необязательные гибкие линкеры (например, линкер с высоким содержанием глицина/серина), описанные в данном документе, могут быть присоединены к С-концу и/или N-концу любой последовательности спейсера, описанной на **Фиг. 9**.

[460] В некоторых аспектах спейсер CAR по настоящему изобретению содержит функциональный фрагмент шарнирной области иммуноглобулина человека, содержащий:

(a) внутреннюю подпоследовательность шарнирной области IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2 (например, человеческого IgG2 или мышинового IgG2A), IgG3, IgG4 или IgM (например, шарнирную область из SEQ ID NO: 4993-5002);

(b) С-концевую подпоследовательность шарнирной области IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2 (например, человеческий IgG2 или мышинный IgG2A), IgG3, IgG4 или IgM (например, шарнирную область из SEQ ID NO: 4993-5002);

(c) N-концевую подпоследовательность шарнирной области IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2 (например, человеческого IgG2 или мышинового IgG2A), IgG3, IgG4 или IgM (например, шарнирную область из SEQ ID NO: 4993-5002);

(d) шарнирную область IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2 (например, человеческого IgG2 или мышинового IgG2A), IgG3, IgG4 или IgM (например, шарнирную область из SEQ ID NO: 4993-5002), удлинённую от 1 до 10 аминокислот в направлении N-концевого домена CH1 и/или С-концевого домена CH2;

(e) подпоследовательность шарнирной области IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2 (например, человеческого IgG2 или мышинового IgG2A), IgG3, IgG4 или IgM (например, шарнирную область из SEQ ID NO: 4993-5002), удлинённую от 1 до 10 аминокислот в направлении N-концевого домена CH1;

(f) подпоследовательность шарнирной области IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2 (например, человеческого IgG2 или мышинового IgG2A), IgG3, IgG4 или IgM (например, шарнирную область из SEQ ID NO: 4993-5002), удлинённую от 1 до 10 аминокислот в направлении С-концевого домена CH2;

(g) последовательность, содержащую 2 или более повторов (a)-(f);

(h) комбинацию (a)-(g), соответствующую одной и той же шарнирной области;

(h) комбинацию (a)-(g), соответствующую разным шарнирным областям; или,

(i) любую их комбинацию.

[461] В некоторых аспектах шарнирная область представляет собой шарнирную область мыши.

[462] В некоторых аспектах описанные в данном документе спейсеры CAR содержат, по существу состоят или состоят из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4831, которая способна связывать антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с ROR1, с трансмембранным доменом.

[463] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена клетка,

экспрессирующая CAR к ROR1, например, CART, например, клетка, экспрессирующая конструкцию CAR к ROR1 или кодирующую ROR1-связывающий CAR, содержащий scFv, CDR или VH- и VL-цепи, где CAR к ROR1 содержит спейсер CAR по настоящему изобретению. Клетка, экспрессирующая CAR к ROR1, например, CART, может быть получена путем конструирования CAR к ROR1, который содержит связывающий домен ROR1 и спейсер CAR по настоящему изобретению, в клетку (например, Т-клетку или НК-клетку), например, для введения субъекту, нуждающемуся в этом.

[464] В некоторых аспектах CAR к ROR1 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5070, где спейсер (подпоследовательность между положениями 268 и 281, указанная в SEQ ID NO: 4867) был заменен последовательностью спейсера, описанной в данном документе. В некоторых аспектах последовательность спейсера, заменяющая подпоследовательность между положениями 268 и 281 в SEQ ID NO:5070, выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:4830-4859 (спейсер 1-спейсер 31). В некоторых аспектах последовательность спейсера SEQ ID NO:4830-4859 дополнительно содержит необязательную N-концевую и/или C-концевую линкерную последовательность SEQ ID NO:4818. В некоторых аспектах подпоследовательность между положениями 268 и 281 в SEQ ID NO:5070 заменена спейсером 1 (SEQ ID NO:4830). В некоторых аспектах CAR к ROR1 содержит последовательность CAR, описанную в Таблице 21. В некоторых аспектах Т-клетка с CAR к ROR1 содержит последовательность CAR, описанную в Таблице 21. В некоторых аспектах CAR к ROR1 содержит последовательность CAR, указанную в любой из SEQ ID NO: 5072, 5073, 5074 или 5075. В некоторых аспектах Т-клетка с CAR к ROR1 содержит последовательность CAR, указанную в любой из SEQ ID NO: 5072, 5073, 5074 или 5075.

[465] Неограничивающие примеры ROR1-связывающих доменов можно найти в **Таблице 19**, например, для антитела R12. Соответственно, в некоторых аспектах CAR к ROR1 содержит связывающий фрагмент, полученный из антител R12, R11 или 2A2 (см. **Таблицу 19**). В некоторых аспектах CAR к ROR1 содержит связывающий фрагмент, полученный из антитела R12, и спейсер, описанный в данном документе, например, спейсер 1 или любой из спейсеров, описанных на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах CAR к ROR1 содержит связывающий фрагмент, полученный из антитела R11, и спейсер, описанный в данном документе, например, спейсер 1 или любой из спейсеров, описанных на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах CAR к ROR1 содержит связывающий фрагмент, полученный из антитела 2A2, и спейсер, описанный в данном документе, например, спейсер 1 или любой из спейсеров, описанных на **Фиг. 9**.

[466] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена клетка, экспрессирующая CAR к CD19, например, CART, например, клетка, экспрессирующая конструкцию CAR к CD19 или кодирующую CD19-связывающий CAR, содержащий scFv, CDR или VH- и VL-цепи, где CAR к CD19 содержит спейсер CAR по настоящему изобретению. Клетка, экспрессирующая CAR к CD19, например, CART, может быть получена путем конструирования CAR к CD19, который содержит связывающий домен

CD19 и спейсер CAR по настоящему изобретению, в клетку (например, Т-клетку или НК-клетку), например, для введения субъекту, нуждающемуся в этом.

[467] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к CAR к CD19, содержащему описанный в данном документе спейсер. В некоторых аспектах CAR FMC63 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5076, где спейсер (подпоследовательность между положениями 266 и 277, указанная в SEQ ID NO: 4876) был заменен последовательностью спейсера, описанной в данном документе. В некоторых аспектах последовательность спейсера, заменяющая подпоследовательность между положениями 266 и 277 в SEQ ID NO:5076, выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:4830-4859 (спейсер 1-спейсер 31). В некоторых аспектах последовательность спейсера SEQ ID NO:4830-4859 дополнительно содержит необязательную N-концевую и/или C-концевую линкерную последовательность SEQ ID NO:4818. В некоторых аспектах подпоследовательность между положениями 266 и 277 SEQ ID NO:5076 заменена спейсером 1 (SEQ ID NO:4830). В некоторых аспектах CAR к CD19 содержит последовательность CAR, описанную в Таблице 23. В некоторых аспектах Т-клетка с CAR к CD19 содержит последовательность CAR, описанную в Таблице 23. В некоторых аспектах CAR к CD19 содержит последовательность CAR, указанную в любой из SEQ ID NO: 4918, 4919, 4920, 4921, 4922, 4923, 4924, или 4925. В некоторых аспектах CAR к CD19 содержит последовательность спейсера CAR, содержащую, состоящую или по существу состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4836, 4837, 4838, 4839, 4840, 4842, 4844 или 4856.

[468] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена клетка, экспрессирующая анти-Her2 CAR, например, CAR-Т, например, клетка, экспрессирующая конструкцию CAR к Her2 или кодируемая Her2-связывающим CAR, содержащим scFv, CDR или VH- и VL-цепи, где CAR к Her2 содержит спейсер CAR по настоящему изобретению. Клетка, экспрессирующая CAR к Her2, например, CART, может быть получена путем конструирования CAR к Her2, который содержит связывающий домен Her2 и спейсер CAR по настоящему изобретению, в клетку (например, Т-клетку или НК-клетку), например, для введения субъекту, нуждающемуся в этом.

[469] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к CAR к Her2, содержащему описанный в данном документе спейсер. В некоторых аспектах CAR к Her2 содержит последовательность CAR, описанную в Таблице 24. В некоторых аспектах CAR к Her2 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5005, 5006, 5007 или 5008. В некоторых аспектах CAR к Her2 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5005, 5006, 5007 или 5008, где линкерная последовательность scFv с SEQ ID NO: 5003 заменена линкерной последовательностью scFv с SEQ ID NO: 5004. В некоторых аспектах CAR к Her2 содержит последовательность спейсера CAR, содержащую, состоящую или по существу состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4835, 4836, 4837 или 4844.

[470] В некоторых аспектах CAR (например, CAR к ROR1, CAR к CD19 или CAR к

Her2, описанные в данном документе) содержит необязательную лидерную последовательность (например, необязательную лидерную последовательность, описанную в данном документе), внеклеточный антигенсвязывающий домен, спейсер CAR по настоящему изобретению (например, спейсер CAR- полученный из шарнирной области, описанный в данном документе), трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, описанный в данном документе) и внутриклеточный стимулирующий домен (например, внутриклеточный стимулирующий домен, описанный в данном документе).

[471] В некоторых аспектах иллюстративная конструкция CAR (например, CAR к ROR1, CAR к CD19 или CAR к Her2, описанные в данном документе) содержит необязательную лидерную последовательность (например, лидерную последовательность, описанную в данном документе), внеклеточный антигенсвязывающий домен, спейсер CAR по настоящему изобретению (например, спейсер CAR, полученный из шарнира или шарнира и константной области, описанный в данном документе), трансмембранный домен, внутриклеточный костимулирующий домен (например, внутриклеточный костимулирующий домен, описанный в данном документе) и внутриклеточный стимулирующий домен.

[472] В некоторых аспектах настоящее изобретение охватывает конструкцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR (например, CAR к ROR1, CAR к CD19 или CAR к Her2, описанные в данном документе), где нуклеиновая кислота молекула содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающий домен (например, ROR1-связывающий домен в CAR к ROR1 по настоящему изобретению, или CD19-связывающий домен в CAR к CD19, описанном в данном документе, или Her2-связывающий домен CAR к Her2, описанного в данном документе), например, который является смежным и находится в той же рамке считывания, что и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен. Типовой внутриклеточный сигнальный домен, который можно использовать в CAR, включает, помимо прочего, один или более внутриклеточных сигнальных доменов, например, CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п. В некоторых аспектах CAR (например, CAR к ROR1, CAR к CD19 или CAR к Her2, описанные в данном документе) может содержать любую комбинацию CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п.

[473] В некоторых аспектах связывающий домен (например, ROR1-связывающий домен в CAR к ROR1 по настоящему изобретению, или CD19-связывающий домен в CAR к CD19, описанном в данном документе, или Her2-связывающий домен CAR к Her2, описанного в данном документе), характеризуется особыми функциональными признаками или свойствами антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела. Например, в некоторых аспектах часть композиции CAR по настоящему изобретению, которая содержит антигенсвязывающий домен, специфически связывается с человеческим антигеном или его фрагментом (например, домен, связывающий ROR1 человека, в CAR к

ROR1 по настоящему изобретению, или домен, связывающий CD19 человека, в CAR к CD19, описанном в данном документе, или Her2-связывающий домен CAR к Her2, описанного в данном документе). В некоторых аспектах scFv является смежным с лидерной последовательностью и находится с ней в одной рамке считывания.

[474] В некоторых аспектах связывающий домен (например, ROR1-связывающий домен в CAR к ROR1 по настоящему изобретению, или CD19-связывающий домен в CAR к CD19, описанном в данном документе, или Her2-связывающий домен CAR к Her2, описанного в данном документе), представляет собой фрагмент, например, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых аспектах связывающий домен (например, ROR1-связывающий домен в CAR к ROR1 по настоящему изобретению, или CD19-связывающий домен в CAR к CD19, описанном в данном документе, или Her2-связывающий домен CAR к Her2, описанного в данном документе), представляет собой Fv, Fab, (Fab')₂ или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). В некоторых аспектах антитела и их фрагменты по настоящему изобретению, используемые для создания CAR по настоящему изобретению, связывают свой белок-мишень (например, ROR1, CD19 или Her2) или его фрагмент с аффинностью дикого типа или повышенной аффинностью. В некоторых случаях scFv человека, используемый в CAR по настоящему изобретению, может быть получен из библиотеки дисплеев.

Модульные спейсеры на основе Ig

[475] В настоящем изобретении также предложен полипептид, кодирующий «модульный спейсер CAR», то есть спейсер CAR, содержащий несколько повторов полипептидной единицы. Этот конкретный тип спейсера CAR по настоящему изобретению позволяет адаптировать длину спейсера для оптимального расположения антигенсвязывающего домена CAR по отношению к эпитопу опухолевого антигена, экспрессируемого на клетке-мишени. Модульные спейсеры CAR, описанные в данном документе, могут быть созданы путем конкатенации двух или более полипептидов, описанных в данном документе (например, спейсеры CAR, полученные из шарнирной области, спейсеры CAR, полученные из петлевой области, или их комбинации). В конкретном аспекте модульный CAR может быть создан путем конкатенации последовательностей, полученных из шарнирной области IgG3, и/или полипептидных последовательностей, содержащих мотивы, идентифицированные в шарнирной области IgG3.

[476] Соответственно, настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащему (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) модульный спейсер CAR по настоящему изобретению, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального

фрагмента, при этом спейсер CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность формулы $C_N-(X_1PRX_2P)_m-[L-(X_1PRX_2P)]_n-C_C$, где (i) модульный спейсер CAR расположен между лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом CAR; (ii) модульный спейсер CAR имеет длину по меньшей мере 15 аминокислот; (iii) m представляет собой целое число, выбранное из 0 или 1; (iv) n представляет собой целое число от 1 до 20; (v) L представляет собой последовательность линкерного полипептида; (vi) C_N представляет собой необязательную N-концевую кэпирующую последовательность; (vii) C_C представляет собой необязательную C-концевую кэпирующую последовательность; и (viii) X_1 и X_2 независимо выбраны из цистеина, глицина, аланина или серина.

[477] В некоторых аспектах модульный спейсер CAR содержит два, три, четыре, пять или шесть мотивов X_1PRX_2P . В некоторых аспектах X_1PRX_2P содержит по меньшей мере один цистеин. В некоторых аспектах X_1PRX_2P представляет собой SEQ ID NO: 4749 (CPRCP). В некоторых аспектах L содержит полипептид SEQ ID NO: 4185 или его фрагмент или вариант. В некоторых аспектах, когда $n > 1$, все L идентичны. В некоторых аспектах, когда $n > 1$, по меньшей мере один L отличается от другого L . В некоторых аспектах C_N содержит полипептид SEQ ID NO: 4088 или его фрагмент или вариант. В некоторых аспектах C_C содержит полипептид SEQ ID NO: 4453 или его фрагмент или вариант.

[478] В некоторых аспектах модульный спейсер CAR содержит последовательность формулы $(CPRCP)_o(EPKSCDTPPPCPRCP)_p$, где o представляет собой целое число, равное 0 или 1, и p представляет собой целое число, равное 1, 2 или 3.

[479] В некоторых аспектах модульный спейсер CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2903; 2983; 3358; 3728; и 3958.

[480] В некоторых аспектах модульный спейсер CAR содержит кэпирующую последовательность C_C , содержащую подпоследовательность полипептида SEQ ID NO: 4453 или его фрагмент или вариант. В некоторых аспектах подпоследовательность полипептида SEQ ID NO: 4453 представляет собой N-концевую AP. В некоторых аспектах модульный спейсер CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4750; 4751; 4752; 4753; и 4754.

[481] В некоторых аспектах модульный спейсер CAR содержит кэпирующую последовательность C_N , содержащую подпоследовательность полипептида SEQ ID NO: 4088 или его фрагмент или вариант. В некоторых аспектах модульный спейсер CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4811.

[482] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащему (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) модульный спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом,

содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального фрагмента, где спейсер содержит аминокислотную последовательность формулы $(EX_3KX_4X_5X_6X_7DTX_8X_9X_{10}TCPRCP)_q$ (SEQ ID NO: 4812), где q представляет собой целое число от 1 до 10, и где: X_3 представляет собой L или P; X_4 представляет собой T или S; X_5 представляет собой R или C; X_6 представляет собой L или отсутствует; X_7 представляет собой G или отсутствует; X_8 представляет собой T или P; X_9 представляет собой H или P; и X_{10} представляет собой T или P.

[483] В настоящем изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) модульный спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального фрагмента, где модульный спейсер CAR содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность A из SEQ ID NO: 4466 и/или по меньшей мере одну аминокислотную последовательность B из SEQ ID NO: 4477, где аминокислотная последовательность спейсера CAR соответствует, например, формуле АВ, АВВ, АВВВ, АВВВВ, А, В, ВА, АА, ВАВ, ВАА, ААА, АВА, ВВВ, ААВВ, АААВ. В некоторых аспектах модули (последовательность А и последовательность В) соединены аминокислотной связью между С-концевой аминокислотой в модуле и N-концевой аминокислотой в следующем модуле.

[484] В некоторых аспектах модульный спейсер CAR по настоящему изобретению соответствует формуле $\{[A/B]-(L1)-[A/B]-(L2)\}_n$, где A/B представляет собой аминокислотную последовательность A с SEQ ID NO: 4466 или аминокислотную последовательность B с SEQ ID NO: 4477; L1 и L2 представляют собой необязательные линкеры (например, линкеры Gly-Ser, такие как линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088); и n представляет собой целое число от 1 до 100.

[485] Типичные модульные спейсеры CAR, полученные из IgG3, содержащие комбинацию последовательности A, указанной в SEQ ID NO: 4466, и/или последовательности B, указанной в SEQ ID NO: 4477, представлены в SEQ ID NO: 4466-4518.

[486] В некоторых аспектах необязательный линкер L1 и/или L2 представляет собой пептидный линкер. В некоторых аспектах необязательный линкер L1 и/или L2 может содержать по меньшей мере примерно два, по меньшей мере около три, по меньшей мере около четыре, по меньшей мере около пять, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 35, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 45, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 55, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 65, по меньшей мере около 70, по

меньшей мере около 75, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 85, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190 или по меньшей мере около 200 аминокислот. В некоторых аспектах необязательный линкер L1 и/или L2 представляет собой глицин/сериновый (Gly-Ser) линкер, как описано ниже.

[487] В некоторых аспектах модульный спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину около 15 аминокислот, около 30 аминокислот, около 45 аминокислот, около 60 аминокислот, около 75 аминокислот, около 90 аминокислот, около 105 аминокислот, около 120 аминокислот, около 135 аминокислот, около 150 аминокислот, около 165 аминокислот, около 180 аминокислот, около 195 аминокислот, около 210 аминокислот, около 225 аминокислот, около 240 аминокислот, около 255 аминокислот, около 270 аминокислот, около 285 аминокислот, около 300 аминокислот.

[488] В некоторых аспектах модульный спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 10 до около 15, от около 15 до около 20, от около 20 до 25, от около 25 до около 30, от около 30 до около 35, от около 35 и около 40, от около 40 до около 45, от около 45 до около 50, от около 50 до около 55, от около 55 до около 60, от около 60 до около 65, от около 65 до около 70, от около 70 до около 75, от около 75 до около 80, от около 80 до около 85, от около 85 до около 90, от около 95 до около 100, от около 100 до около 105, от около 105 до около 110, от около 110 до около 115, от около 115 до около 120, от около 120 до около 125, от около 125 до около 130, от около 130 до около 135, от около 135 до около 140, от около 140 до около 145, от около 145 до около 150, от около 150 до около 155, от около 155 до около 160, от около 160 до около 165, от около 165 до около 170, от около 170 до около 175, от около 175 до 180, от около 180 до около 185, от около 185 до около 190, от около 190 до около 196, от около 195 до около 200, от около 200 до около 205, от около 205 до около 210, от около 210 до около 215, от около 215 до около 220, от около 220 до около 225, от около 225 до около 230, от около 230 до около 235, от около 235 до около 240, от около 240 до около 245, от около 245 до около 250, от около 250 до около 255, от около 255 до около 260, от около 260 до около 265, от около 265 до около 270, от около 270 до около 275, от около 275 до около 280, от около 280 до около 285, от около 285 до около 290, от около 290 до около 295 или от около 295 до около 300 аминокислот.

Линкеры

[489] В некоторых аспектах любой спейсер CAR по настоящему изобретению (например, любой спейсер CAR, описанный в Таблицах 1, 3, 5, 7, 9A, 9B, 11, 13, 15 или 17, необязательно содержащий N- и C-концевые последовательности описанные в Таблицах 2, 4, 6, 8, 10A, 10B, 12, 14, 16 или 18, или любой модульный спейсер CAR, описанный в данном документе), могут содержать необязательный N-концевой линкер и/или необязательный C-концевой линкер. Гибкие линкерные последовательности, известные в

данной области техники, могут быть использованы в качестве необязательных линкеров. В некоторых аспектах линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В контексте данного документа термин «глицин/серин» используется взаимозаменяемо с термином «Gly/Ser» и относится к линкерной последовательности, содержащей повторы аминокислот глицина (G, Gly) и/или серина (S, Ser), как показано в качестве примера ниже.

[490] В некоторых аспектах необязательный линкер представляет собой глицин/сериновый линкер в соответствии с формулой $[(\text{Gly})_n\text{-Ser}]_m$ (SEQ ID NO: 4813), где n представляет собой любое целое число от 1 до 100, а m представляет собой любое целое число от 1 до 100. В других аспектах глицин-сериновый линкер соответствует формуле $[(\text{Gly})_x\text{-Sery}]_z$ (SEQ ID NO: 4814), при этом x представляет собой целое число от 1 до 4, y представляет собой 0 или 1, а z представляет собой целое число от 1 до 50. В некоторых аспектах необязательный линкер содержит последовательность G_n (SEQ ID NO: 4815), где n может представлять собой целое число от 1 до 100. В некоторых аспектах необязательный линкер может содержать последовательность $(\text{GlyAla})_n$ (SEQ ID NO: 4816), где n представляет собой целое число от 1 до 100.

[491] В некоторых аспектах последовательность необязательного линкера имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4817. В некоторых аспектах последовательность необязательного линкера представляет собой GGGSG (SEQ ID NO: 4818). В некоторых аспектах последовательность необязательного линкера представляет собой GGGGSG (SEQ ID NO: 5088).

[492] В других аспектах необязательный линкер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4819. В других аспектах необязательный линкер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4820. В других аспектах необязательный линкер может содержать последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4821. В других аспектах необязательный линкер может содержать последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4822. В этих случаях n может представлять собой целое число от 1 до 100. В других случаях n может быть целым числом от одного до 20, т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых аспектах n представляет собой целое число от 1 до 100.

[493] Примеры необязательного линкера включают, но не ограничиваются ими, например, последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4823, 4824, 4825, 4826, 4827, 4828, или 4829.

[494] В некоторых аспектах необязательный линкер содержит последовательность PGG . В некоторых аспектах необязательный линкер содержит дополнительные аминокислоты помимо глицина и серина. В некоторых аспектах необязательный линкер содержит 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, отличных от глицина/серина. В некоторых аспектах линкер Gly/Ser содержит по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере 95% аминокислот в виде глицина или

серина.

[495] В некоторых конкретных аспектах необязательный линкер имеет длину от 1 до 10 аминокислот. В некоторых аспектах необязательный линкер имеет длину от около 5 до около 10, от около 10 до около 20, от около 20 до около 30, от около 30 до около 40, от около 40 до около 50, от около 50 до около 60, от около 60 до около 70, от около 70 до около 80, от около 80 до около 90 или от около 90 до около 100 аминокислот.

Рациональный дизайн спейсеров CAR, полученных из Ig

[496] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложены спейсеры CAR, полученные из Ig, выбранные для расположения антигенсвязывающей части CAR на оптимальном расстоянии или в оптимальном положении для взаимодействия с эпитопом, расположенным на белке-мишени. Как схематично показано на **Фиг. 7**, можно оценить оптимальную длину спейсера CAR, например, путем оценки или измерения расстояния между эпитопом на поверхности клетки-мишени и оценки или измерения сигнального синапса, т.е. расстояние между поверхностью клетки, экспрессирующей CAR (например, CART-клетки), и поверхностью клетки-мишени.

[497] В некоторых аспектах при расчете можно предположить, что ширина сигнального синапса составляет приблизительно 150 ангстрем. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени можно оценить, например, с помощью рентгеновской кристаллографии, ЯМР или крио-ЭМ структуры. В других аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени можно оценить, например, с помощью спектроскопических методов, например, с использованием метода резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET).

[498] В некотором аспекте оценки можно использовать для выбора подмножества последовательностей спейсеров-кандидатов CAR для скрининга. Эти последовательности могут быть впоследствии подвергнуты скринингу, как описано в разделе «Примеры» настоящей заявки, чтобы определить, например, какой спейсер (и, следовательно, длина спейсера) приводит к повышенной секреции цитокинов или лизису клеток-мишеней.

[499] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащему (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR по настоящему изобретению, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области человеческого иммуноглобулина или ее функционального фрагмента, где

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 150 до около 125 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 125 до около 100 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 100 до около 75 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 75 до около 36 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 35 аминокислот до около 21 аминокислоты; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 20 до около 16 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 15 до около 11 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å; или,

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 10 до около 5 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å.

[500] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащему (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR по настоящему изобретению, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области человеческого иммуноглобулина или ее функционального фрагмента, где

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 600 Å до около 500 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 500 Å до около 400 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 400 Å до около 300 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 300 Å до около 150 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 150 Å до около 80 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 80 Å до около 60 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 60 Å до около 40 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å; или,

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 40 Å до около 20 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å.

[501] В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 или 150 аминокислот. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 500, около 510, около 520, около 530, около 540, около 550, около 560, около 570, около 580, около 590 или около 600 Å.

[502] В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 или 125 аминокислот. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 400, около 410, около 420, около 430, около 440, около 450, около 460, около 470, около 480, около 490 или около 500 Å.

[503] В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 аминокислот. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 300, около 310, около 320, около 330, около 340, около 350, около 360, около 370, около 380, около 390 или около 400 Å.

[504] В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å, а спейсер имеет длину 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75 аминокислот. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å, а спейсер имеет длину около 150, около 160, около 170, около 180, около 190, около 200, около 210, около 220, около 230, около 240, около 250, около 260, около 270, около 280, около 290 или около 300 Å.

[505] В одном аспекте расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å, а спейсер имеет длину 21, 22, 23,

24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислот. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å, а спейсер имеет длину около 80, около 90, около 100, около 110, около 120, около 130, около 140 или около 150 Å.

[506] В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å, а спейсер имеет длину 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å, а спейсер имеет длину около 60, около 65, около 70, около 75 или около 80 Å.

[507] В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å, а спейсер имеет длину 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å, а спейсер имеет длину около 40, около 45, около 50, около 55 или около 60 Å.

[508] В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å, а спейсер имеет длину 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å, а спейсер имеет длину около 20, около 25, около 30, около 35 или около 40 Å.

[509] Также предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом на опухолевом антигене, экспрессированном на клетке-мишени; (ii) трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный домен; и (iv) спейсер CAR по настоящему изобретению, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области человеческого иммуноглобулина или ее функционального фрагмента, где

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 450 Å до около 375 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 375 Å до около 300 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 300 Å до около 225 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 225 Å до около 100 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 100 Å до около 60 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от

около 15 Å до около 25 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 60 Å до около 45 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å;

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 45 Å до около 30 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å; или,

спейсер CAR по настоящему изобретению имеет длину от около 30 Å до около 15 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å.

[510] В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени имеет длину менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 450 Å, около 440 Å, около 430 Å, около 420 Å, около 410 Å, около 400 Å, около 390 Å, около 380 Å или около 375 Å. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 375 Å, около 370 Å, около 360 Å, около 350 Å, около 340 Å, около 330 Å, около 320 Å, около 310 Å или около 300 Å. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 300 Å, около 290 Å, около 280 Å, около 270 Å, около 260 Å, около 250 Å, около 240 Å, около 230 Å или около 225 Å. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å, спейсер имеет длину около 225 Å, около 220 Å, около 210 Å, около 200 Å, около 190 Å, около 180 Å, около 170 Å, около 160 Å, около 150 Å, около 140 Å, около 130 Å, около 120 Å, около 110 Å или около 100 Å. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å, а спейсер имеет длину около 100 Å, около 95 Å, около 90 Å, около 85 Å, около 80 Å, около 75 Å, около 70 Å, около 65 Å или около 60 Å. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å, а спейсер имеет длину около 60 Å, около 55 Å, около 50 Å и около 45 Å. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å, а спейсер имеет длину около 45 Å, около 40 Å, около 35 Å или около 30 Å. В некоторых аспектах расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å, а спейсер имеет длину около 30 Å, около 25 Å, около 20 Å или около 15 Å.

Антигенсвязывающие домены

[511] В некоторых аспектах полипептид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению (т. е. спейсер CAR, полученный из шарнирной области, спейсер CAR, полученный из петлевой области, или их комбинацию), содержит антигенсвязывающий домен, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, ScFv), которое специфически

связывается с эпитопом на опухолевом антигене, например, протеинкиназу, такую как тирозинпротеинкиназа.

[512] В некоторых аспектах опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из ROR1, HER2, AFP, CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-1 IRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюис Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатного рецептора альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозила GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатного рецептора альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белка спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутанта p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутанта Ras, hTERT, точек разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитого гена ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, внеклеточной части белка APRIL и любых их комбинаций.

[513] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен CAR по настоящему изобретению представляет собой IgNAR, Fab, Fab', F(ab)'2, F(ab)'3, Fv, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), bis-scFv, а (scFv)₂, миниантитело, диатело, триатело, тетратело, интратело, стабилизированный дисульфидом белок Fv (dsFv), монотело или наноантитело. В некоторых случаях scFv могут быть получены в соответствии со способом, известным в данной области техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv могут быть получены путем связывания вместе областей VH и VL, используя гибкие полипептидные линкеры. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом. Длина линкера может в значительной степени повлиять на то, каким образом будут складываться и взаимодействовать переменные участки. Фактически, при применении короткого полипептидного линкера (например, из 5-10 аминокислот) можно предотвратить внутрицепочечный фолдинг. Межцепочечный фолдинг также необходим для того, чтобы соединить вместе две переменные области с образованием функционального сайта связывания эпитопа. Примеры ориентации и размера линкера см., например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, публикации патентных заявок США № 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 и публикации PCT №№ WO 2006/020258 и WO

2007/024715, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[514] scFv может содержать линкер, например, из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более аминокислотных остатков между областями VL и VH. Линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В еще одном аспекте линкерная последовательность содержит наборы глициновых и сериновых повторов, таких как $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, где n представляет собой положительное целое число, которое равняется или больше 1 (SEQ ID NO:81). В некоторых аспектах линкер может представлять собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ (SEQ ID NO:82) или $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ (SEQ ID NO:83), или любой богатый глицином и серином линкер, описанный выше.

[515] В некоторых аспектах линкер может представлять собой GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:4885), например, в scFv к CD19, таком как scFv на основе FMC63. В других аспектах линкер может представлять собой GSTSGSGKPGSGEGS (SEQ ID NO:4886), например, на основе анти-Her2.

[516] Вариации длины линкера могут сохранять или повышать активность, обуславливая превосходную эффективность в исследованиях активности.

[517] В некоторых аспектах аминокислотная последовательность антигенсвязывающего домена или других частей или всего CAR может быть модифицирована, например, аминокислотная последовательность, описанная в данном документе, может быть модифицирована, например, путем консервативной замены. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

[518] В некоторых конкретных аспектах опухолевый антиген представляет собой трансмембранный рецептор тирозин-протеинкиназы «ROR1», также известный как рецептор нейротрофической тирозинкиназы 1-го типа (NTRKR1). Человеческие аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотные последовательности изоформ 1 и 2 предшественников ROR1 человека можно найти под номерами доступа NP_005003.2 и NP_001077061.1, соответственно, а последовательности мРНК, кодирующие их, можно найти под номерами доступа NM_005012.3 и NM_001083592.1, соответственно. В контексте данного документа термин «ROR1» включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и сплайс-варианты полноразмерного ROR1 дикого

типа. В некоторых аспектах антигенсвязывающая часть CAR распознает и связывает антиген во внеклеточном домене белка ROR1. В некоторых аспектах белок ROR1 экспрессируется на раковой клетке.

[519] ROR1 является членом семейства орфанных рецепторов типа рецепторных тирозинкиназ (ROR). У человека ROR1 кодируется геном ROR1. Белок, кодируемый этим геном, представляет собой рецепторную тирозинкиназу, которая модулирует рост в центральной нервной системе и играет роль в метастазировании раковых клеток. ROR1 считается псевдокиназой, которая не обладает значительной каталитической активностью и взаимодействует с неканоническим сигнальным путем Wnt. Увеличение экспрессии ROR1 связано, например, с В-клеточным хроническим лимфолейкозом. ROR1 в экспрессируется в циркулирующих опухолевых клетках на высоком уровне и способствует инвазии клеток рака поджелудочной железы (Xu et al., 2018, Mol. Med. Rep. 18:5087-5094). ROR1 также, по-видимому, способствует прогрессированию опухоли при раке эндометрия, аналогично его роли при раке яичников (Henry et al, 2018, Gynecol. Oncol. 148:576-584). ROR1 экспрессируется в эпителиальных опухолях и гомогенно экспрессируется в подмножестве рака яичников, трижды негативного рака молочной железы и рака легкого (Balakrishnan et al., 2017, Clin, Cancer Res. 23:3061-3071). Экспрессия ROR1 также была положительно связана с метастазированием в лимфатические узлы у пациентов с колоректальным раком (Zhou et al., 2017, Oncotarget 8:32864-32872).

[520] В некоторых аспектах ингибиторы ROR1, например, CAR по настоящему изобретению или клетки, экспрессирующие эти CAR, можно использовать для лечения В-клеточных злокачественных новообразований (например, лейкозий, таких как CLL, и В-клеточных лимфом, таких как мантийно-клеточная лимфома; ALL, малая лимфоцитарная лимфома, В-клеточная лимфома из маргинальных клеток и лимфома Беркетта) или злокачественных эпителиальных новообразований (например, рака молочной железы, почечно-клеточного рака, рака легкого, колоректального рака, рака яичников и меланомы).

[521] Иллюстративный CAR к ROR1 описан Hudecek, et al. Clin. Cancer Res. 19.12(2013):3153-64, включенной в данный документ посредством ссылки. В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению включает Т-клетку с CAR к ROR1, описанный Hudecek et al. (например, созданный, как описано Hudecek et al. на стр. 3155, первый полный абзац, включенный в данный документ посредством ссылки), где спейсер, описанный Hudecek, был заменен спейсером CAR по настоящему изобретению. В других аспектах CAR к ROR1 по настоящему изобретению содержит антитело или его фрагмент, содержащие последовательности VH и/или VL моноклональных антител к ROR1 2A2, R11 и R12, описанных Hudecek et al. в абзаце, соединяющем страницы 3154-55; Baskar et al. MAbs 4(2012):349-61; и Yang et al. PLoS ONE 6(2011):e21018, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[522] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему

изобретению способен перекрестно конкурировать с антителом к ROR1, например, антителами R11, R12 или 2A2. Последовательности антител R11, R12 и 2A2 показаны в **Таблице 19**. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен, применимый для настоящего изобретения, связывается с одним и тем же эпитопом антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2.

Таблица 19. CDR антител R11, R12 и 2A2

VH R11 (SEQ ID NO:4887)	VH R12 (SEQ ID NO: 4895)	VH 2A2 (SEQ ID NO: 4903)
CDR1 VH R11 (SEQ ID NO: 4888)	CDR1 VH R12 (SEQ ID NO: 4896)	CDR1 VH 2A2 (SEQ ID NO: 4904)
CDR2 VH R11 (SEQ ID NO: 4889)	CDR2 VH R12 (SEQ ID NO: 4897)	CDR2 VH 2A2 (SEQ ID NO: 4905)
CDR3 VH R11 (SEQ ID NO: 4890)	CDR3 VH R12 (SEQ ID NO: 4898)	CDR3 VH 2A2 (SEQ ID NO: 4906)
VL R11 (SEQ ID NO: 4891)	VL R12 (SEQ ID NO: 4899)	VL 2A2 (SEQ ID NO: 4907)
CDR1 VL R11 (SEQ ID NO: 4892)	CDR1 VL R12 (SEQ ID NO: 4900)	CDR1 VL 2A2 (SEQ ID NO: 4908)
CDR2 VL R11 (SEQ ID NO: 4893)	CDR2 VL R12 (SEQ ID NO: 4901)	CDR2 VL 2A2 (SEQ ID NO: 4909)
CDR3 VL R11 (SEQ ID NO: 4894)	CDR3 VL R12 (SEQ ID NO: 4902)	CDR3 VL 2A2 (SEQ ID NO: 4910)

[523] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит CDR3 VH антитела R11. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из антитела R11. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из антитела R11. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению, например, scFv R11, содержит VH и VL из антитела R11. В некоторых аспектах scFv R11 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG2, например, спейсера 1 (SEQ ID NO: 4830) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv R11 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG1, например, спейсера 11 (SEQ ID NO: 4840) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv R11 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG3, например, спейсера 13 (SEQ ID NO: 4841) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818. В некоторых аспектах scFv R11 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG2, например, спейсера 14 (SEQ ID

NO: 4842) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[524] В некоторых аспектах scFv R11 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG3, например, спейсера 4 (SEQ ID NO: 4833) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv R11 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG3, например, спейсера 5 (SEQ ID NO: 4834) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv R11 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG3, например, спейсера 6 (SEQ ID NO: 4835) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[525] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит CDR3 VH антитела R12. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из антитела R12. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из антитела R12. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению, например, scFv R12, содержит VH и VL из антитела R12. В некоторых аспектах scFv R12 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG2, например, спейсера 1 (SEQ ID NO: 4830) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv R12 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG1, например, спейсера 11 (SEQ ID NO: 4840) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv R12 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG3, например, спейсера 13 (SEQ ID NO: 4841) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv R12 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG2, например, спейсера 14 (SEQ ID NO: 4842) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[526] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит CDR3 VH антитела 2A2. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из антитела 2A2. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из антитела 2A2. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению, например, scFv 2A2, содержит VH и VL из антитела 2A2. В некоторых аспектах scFv 2A2 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG2, например, спейсера 1 (SEQ ID NO: 4830) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv 2A2 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG1, например, спейсера 11 (SEQ ID NO: 4840) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv 2A2 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG3, например, спейсера 13 (SEQ ID NO: 4841) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818. В некоторых аспектах scFv 2A2 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG2, например, спейсера 14 (SEQ ID NO: 4842) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[527] В некоторых аспектах scFv 2A2 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG3, например, спейсера 9 (SEQ ID NO: 4838) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах scFv 2A2 связан с трансмембранным доменом с помощью линкера IgG3, например, спейсера 10 (SEQ ID NO: 4839) и, необязательно, линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088.

[528] В других аспектах CAR по настоящему изобретению, нацеленный на ROR1, содержит антитело или его фрагмент (например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)), нацеленный на ROR1, включая антитела, описанные в патентах США №№ US9316646B2, выданном 12 сентября 2017 г., или US9758586B2, выданном 19 апреля 2016 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

[529] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, где антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен связаны спейсером CAR по настоящему изобретению, при этом спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4830, и необязательно линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088, и где антигенсвязывающий домен содержит CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и VL CDR3 из антитела R11, например, VH и VL из антитела R11. В некоторых аспектах спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4840, SEQ ID NO: 4841 или SEQ ID NO: 4842, и необязательно линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах общая длина необязательного линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088 и спейсера составляет от около 180 Å до около 250 Å. В некоторых аспектах общая длина необязательного линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088 и спейсера составляет около 200 Å. В некоторых аспектах общая длина необязательного линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088 и спейсера составляет около 180 Å, около 190 Å, около 200 Å, около 210 Å, около 210 Å, около 230 Å, около 240 Å или около 250 Å.

[530] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, где антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен связаны спейсером CAR по настоящему изобретению, при этом спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4830, и необязательно линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088, и где антигенсвязывающий домен содержит CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и VL CDR3 из антитела R12, например, VH и VL из антитела R12. В некоторых аспектах спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4840, SEQ ID NO: 4841 или SEQ ID NO: 4842, и необязательно линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах общая длина необязательного линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088 и спейсера составляет от около 35 Å до около 55 Å. В некоторых аспектах общая длина необязательного линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088 и спейсера составляет около 45 Å. В некоторых аспектах общая длина необязательного линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088 и спейсера составляет около 35 Å, около 40 Å, около 45 Å, около 50 Å или около 55 Å.

[531] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению содержит

антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, где антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен связаны спейсером CAR по настоящему изобретению, при этом спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4830, и необязательно линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088, и где антигенсвязывающий домен содержит CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и VL CDR3 из антитела 2A2, например, VH и VL из антитела 2A2. В некоторых аспектах спейсер содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4840, SEQ ID NO: 4841 или SEQ ID NO: 4842, и необязательно линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088. В некоторых аспектах общая длина необязательного линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088 и спейсера составляет от около 35 Å до около 55 Å. В некоторых аспектах общая длина необязательного линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088 и спейсера составляет около 45 Å. В некоторых аспектах общая длина необязательного линкера SEQ ID NO: 4818 или 5088 и спейсера составляет около 35 Å, около 40 Å, около 45 Å, около 50 Å или около 55 Å.

[532] В некоторых аспектах фрагменты антитела, связывающие антиген ROR1, (например, scFv) конъюгированы или слиты с биологически активной молекулой, например, с образованием CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащего спейсер CAR по настоящему изобретению, т.е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), который способствует иммунным клеткам, например, Т-клеткам, реагировать на клетки, экспрессирующие ROR1.

[533] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, то есть спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), ингибирующий ROR1, содержит моноклональное антитело к ROR1 UC-961 (цирмтузумаб) или его антигенсвязывающую часть. См., например, идентификационный номер клинического испытания NCT02222688. Цирмтузумаб можно использовать для лечения злокачественных новообразований, например, хронического лимфолейкоза (CLL), рака яичников и меланомы. См., например, Hojjat-Farsangi et al. PLoS One. 8(4): e61167; и NCT02222688.

[534] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т.е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), ингибирующий CD19, содержит антитело к CD19 или его антигенсвязывающую часть.

[535] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т.е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), ингибирующий Her2, содержит антитело к Her2 или его антигенсвязывающую часть.

Сигнальные, трансмембранные, костимулирующие домены

[536] В некоторых аспектах внутриклеточный домен CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е.

спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию) представляет собой сигнальный домен, полученные из CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых аспектах, CAR дополнительно содержит костимулирующий домен, полученный из 2B4, HVEM, ICOS, LAG3, DAP10, DAP12, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), глюкокортикоид-индуцированного рецептора фактора некроза опухоли (GITR), лимфоцитарного функционального антигена-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C или B7-H3. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит костимулирующий домен 4-11BB. В некоторых аспектах костимулирующий домен 4-1BB содержит SEQ ID NO: 4869.

[537] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию) содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. В некоторых аспектах трансмембранный домен способен к передаче сигналов внутриклеточному(-ым) домену(-ам) каждый раз, когда CAR по настоящему изобретению связывается с мишенью.

[538] В некоторых аспектах трансмембранный домен может включать по меньшей мере трансмембранную(-ые) область(-и), например, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C, или CD19.

[539] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию) дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен, например, костимулирующий домен, описанный в данном документе. В некоторых аспектах костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), и 4-1BB (CD137). В некоторых аспектах костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы,

состоящей из молекулы МНС класса I, белков-рецепторов TNF, иммуноглобулин-подобных белков, рецепторов цитокинов, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора лиганда Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, и лиганда, который специфически связывается с CD83. В некоторых аспектах костимулирующий домен включает 4-1BB, CD27, CD28 или ICOS.

[540] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию) дополнительно содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен 4-1BB и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен включает функциональный сигнальный домен CD27 и/или функциональный сигнальный домен CD3-дзета.

[541] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, то есть спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию) дополнительно содержит лидерную последовательность. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен содержит CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870.

[542] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, то есть спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию) содержит необязательную лидерную последовательность (например, необязательную лидерную последовательность, описанную в данном документе), внеклеточный антигенсвязывающий домен, спейсер CAR по настоящему изобретению, трансмембранный домен (например, трансмембранный домен, описанный в данном документе) и внутриклеточный стимулирующий домен (например, внутриклеточный стимулирующий домен, описанный в данном документе).

[543] В некоторых аспектах иллюстративная конструкция CAR по настоящему изобретению содержит необязательную лидерную последовательность (например,

лидерную последовательность, описанную в данном документе), внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнир, трансмембранный домен, внутриклеточный костимулирующий домен (например, внутриклеточный костимулирующий домен, описанный в данном документе), и внутриклеточный стимулирующий домен.

[544] В некоторых аспектах трансмембранный домен CAR по настоящему изобретению (например, CAR, нацеленный на ROR1, CD19 или Her 2) включает трансмембранный домен, который связан с внутриклеточным доменом CAR линкером.

[545] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 1, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4830, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872 или любую их комбинацию.

[546] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 15, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4843, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[547] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 21, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4849, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[548] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 4, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4833, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[549] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR,

содержащий: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 5, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4834, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[550] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 6, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4835, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[551] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 13, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4841, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[552] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 21, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4889, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[553] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 28, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4856, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[554] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR,

содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет от 35Å до 55Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[555] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет около 45 Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[556] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет от 180Å до 250Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[557] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет около 200 Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[558] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-

1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет от 35 Å до 55 Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[559] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет около 45 Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[560] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен CAR, содержащий, состоящий или по существу состоящий из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 5049-5063.

[561] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088, (iii) спейсер 1, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4830, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[562] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088, (iii) спейсер 15, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4843, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[563] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088, (iii) спейсер 21, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4849, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[564] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 4, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4833, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[565] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 5, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4834, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[566] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 6, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4835, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[567] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 13, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4841, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[568] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 21, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4889, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[569] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 28, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4856, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[570] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868. и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет от 35Å до 55Å. В некоторых аспектах CAR содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[571] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет около 45 Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[572] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет от 180Å до 250Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[573] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv R11,

содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет около 200 Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[574] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет от 35Å до 55Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[575] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет около 45 Å. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[576] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, содержащий, состоящий или по существу состоящий из последовательности белка, указанной в SEQ ID NO: 5049-5063.

Биспецифические CAR

[577] В некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению являются биспецифическими CAR. Соответственно, в некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, кодирует по меньшей мере полипептид биспецифического CAR (например, CAR, нацеленный на первый антиген и второй антиген).

[578] В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен CAR по настоящему изобретению представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело обладает специфичностью не более чем к двум антигенам. Молекула

биспецифического антитела характеризуется первой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания к первому эпитопу, и второй последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу. В некоторых аспектах первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В некоторых аспектах первый и второй эпитопы перекрываются. В других аспектах первый и второй эпитопы не перекрываются. В некоторых аспектах первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например, на разных белках (или на разных субъединицах мультимерного белка).

[579] В некоторых аспектах молекула биспецифического антитела содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания к первому эпитопу, а также последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которая обладают специфичностью связывания ко второму эпитопу. В некоторых аспектах молекула биспецифического антитела содержит полуантитело, обладающее специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и полуантитело, обладающее специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В некоторых аспектах молекула биспецифического антитела содержит полуантитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания к первому эпитопу, и полуантитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания ко второму эпитопу. В некоторых аспектах молекула биспецифического антитела содержит scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания в отношении второго эпитопа.

[580] В некоторых аспектах молекула антитела представляет собой полиспецифическую (например, биспецифическую или триспецифическую) молекулу антитела. В данной области техники известны протоколы получения биспецифических или гетеродимерных молекул антител.

[581] Внутри каждого антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела (например, scFv) молекулы биспецифического антитела VH может располагаться выше или ниже VL. В некоторых аспектах расположенное выше антитело или фрагмент антитела (например, scFv) расположено так, что его VH (VH₁) расположено выше его VL (VL₁), а расположенное ниже антитело или фрагмент антитела (например, scFv) расположено так, что его VL (VL₂) выше его VH (VH₂), так что общая молекула биспецифического антитела имеет порядок расположения VH₁-VL₁-VL₂-VH₂. В других аспектах расположенное выше антитело или фрагмент антитела (например, scFv) расположено так, что его VL (VL₁) расположено выше его VH (VH₁), а расположенное ниже антитело или фрагмент антитела (например, scFv) расположено так, что его VH (VH₂) выше его VL (VL₂), так что общая молекула биспецифического антитела имеет порядок расположения VL₁-VH₁-VH₂-VL₂. Необязательно линкер расположен между

двумя антителами или фрагментами антител (например, scFv), например, между VL₁ и VL₂, если конструкция имеет расположение VH₁-VL₁-VL₂-VH₂, или между VH₁ и VH₂, если конструкция имеет порядок расположения VL₁-VH₁-VH₂-VL₂. Линкер может представлять собой линкер, как описано в данном документе, например, линкер (Gly₄Ser)_n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6, например, 4 (SEQ ID NO: 83). В общем, линкер между двумя scFv должен быть достаточно длинным, чтобы избежать неправильного спаривания между доменами двух scFv. Необязательно, линкер расположен между VL и VH первого scFv. Необязательно, линкер расположен между VL и VH второго scFv. В конструкциях с несколькими линкерами любые два или более линкера могут быть одинаковыми или разными. Соответственно, в некоторых аспектах биспецифический CAR содержит VL, VH и необязательно один или более линкеров в порядке расположения, как описано в данном документе.

[582] В некоторых аспектах молекула антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела, имеющую первый эпитоп, расположенный на первом опухолевом антигене (например, ROR1), и второй эпитоп, расположенный на втором антигене, например, CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b или CD79a. В некоторых аспектах биспецифическое антитело связывается с первым эпитопом, где первый эпитоп расположен на CD19, и со вторым эпитопом, где второй эпитоп расположен на CD20. В некоторых аспектах биспецифическое антитело связывается с первым эпитопом, где первый эпитоп расположен на CD19, и со вторым эпитопом, где второй эпитоп расположен на CD22. В некоторых аспектах биспецифическое антитело связывается с первым эпитопом, где первый эпитоп расположен на CD20, и со вторым эпитопом, где второй эпитоп расположен на CD22. В некоторых аспектах молекула антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела, имеющую первую специфичность связывания в отношении первого В-клеточного эпитопа и вторую специфичность связывания в отношении еще одного В-клеточного антигена. Например, в некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела имеет первую специфичность связывания в отношении первого В-клеточного эпитопа, например, в отношении ROR1, и вторую специфичность связывания в отношении одного или более из В-клеточных эпитопов CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b или CD79a.

Индукцируемые CAR

[583] В некоторых аспектах экспрессия CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащего спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию) регулируется конститутивным промотором, например, немедленно-ранним промотором цитомегаловируса (CMV), фактором роста элонгации-1α (EF-1α), ранним промотором обезьяньего вируса 40 (SV40), вирусом опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотором из длинных терминальных повторов (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотором MoMuLV, промотором вируса птичьего лейкоза, раннего промотора

вируса Эпштейна-Барра, промотора вируса саркомы Рауса, а также промоторами генов человека, такими как, но не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Однако регуляция экспрессии CAR по настоящему изобретению не ограничивается использованием конститутивного промотора.

[584] Таким образом, в некоторых аспектах CAR по настоящему изобретению, кодируемый полинуклеотидом, описанным в данном документе, представляет собой индуцируемый CAR. Термин «индуцируемый» относится к присутствию «индуцируемого промотора», т.е. нуклеотидной последовательности, которая при функциональном соединении с полинуклеотидом, который кодирует или определяет генный продукт, например, CAR по настоящему изобретению, вызывает выработку генного продукта в клетке по существу только тогда, когда в клетке присутствует индуктор, который соответствует промотору. Использование индуцибельных промоторов обеспечивает молекулярный переключатель, способный запускать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда подобная экспрессия является желаемой, или останавливать экспрессию, когда она не является желаемой. Примеры индуцируемых промоторов включают, помимо прочего, промотор металлотинина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и тетрациклиновый промотор.

[585] В других аспектах полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, содержит «тканеспецифический» промотор, т.е. нуклеотидную последовательность, которая при функциональном связывании с полинуклеотидом, который кодирует или определяет генный продукт, например, CAR по настоящему изобретению, вызывает выработку генного продукта в клетке по существу только в том случае, если клетка является клеткой такого типа ткани, который соответствует промотору.

Векторы

[586] В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению (т.е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т.е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), функционально связаны с регуляторным элементом. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

[587] В некоторых аспектах вектор представляет собой вектор для переноса. Термин «вектор для переноса» относится к композиции вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту (например, полинуклеотид по настоящему изобретению) и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Многочисленные векторы известны в данной области техники, включая, помимо прочего, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор для переноса» включает способную к автономной репликации плазмиду или

вирус. Термин также следует воспринимать как такой, который дополнительно включает неплазмидные и невирусные соединения, которые способствуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизинное соединение, липосома и т. п. К примерам вирусных векторов переноса относятся, помимо прочего, аденовирусные векторы, векторы на основе адено-ассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

[588] В некоторых аспектах вектор представляет собой вектор экспрессии. Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид (например, полипептид по настоящему изобретению), содержащий последовательности регуляции экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточно действующих в *cis*-положении элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой-хозяином или в *in vitro* системе экспрессии. Векторы экспрессии включают все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

[589] В некоторых аспектах вектор представляет собой вирусный вектор, вектор млекопитающего или бактериальный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, лентивирусного вектора, вектора на основе вируса Сендай, бакуловirusного вектора, вектора на основе вируса Эпштейна-Барра, паповавирусного вектора, вектора на основе вируса осповакцины, вектора на основе вируса простого герпеса, гибридного вектора и вектора на основе AAV.

[590] В некоторых аспектах аденовирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор третьего поколения. ADEASY™ является самым популярным методом создания аденовирусных векторных конструкций. Система состоит из двух типов плазмид: челночные векторы (или векторы для переноса) и аденовирусные векторы. Представляющий интерес трансген клонируют в челночный вектор, верифицируют и линейаризуют с помощью рестрикционного фермента PmeI. Эта конструкция затем трансформируется в клетки ADEASIER-1, которые представляют собой клетки *E. coli* BJ5183, содержащие PADEASY™. PADEASY™ представляет собой аденовирусную плазмиду размером ~33 т.п.н., содержащую аденовирусные гены, необходимые для продукции вируса. Челночный вектор и аденовирусная плазида имеют соответствующие левое и правое плечи гомологии, которые облегчают гомологичную рекомбинацию трансгена в аденовирусную плазмиду. Можно также совместно трансформировать стандарт BJ5183 с помощью суперспирального PADEASY™ и челночного вектора, но этот метод приводит к более высокому уровню нерекомбинантных аденовирусных плазмид. Затем рекомбинантные аденовирусные плазмиды проверяют на размер и правильность профилей рестриктов, чтобы определить, что трансген был вставлен в аденовирусную плазмиду, и что не произошло других паттернов рекомбинации. После

проверки рекомбинантную плазмиду линеаризуют с помощью PacI для получения линейной конструкции двухцепочечной ДНК, фланкированной ITR. Клетки 293 или 911 трансфицировали линеаризованной конструкцией, и вирус можно собирать примерно через 7-10 дней. В дополнение к этому способу, другие способы создания аденовирусных векторных конструкций, известные в данной области техники на момент подачи настоящей заявки, могут быть использованы для практического применения описанных в данном документе способов.

[591] В других аспектах вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор, например, лентивирусный вектор (например, лентивирусный вектор третьего или четвертого поколения). Термин «лентивирус» относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов благодаря способности инфицировать неделяющиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они являются одним из наиболее эффективных вариантов вектора для доставки генов. ВИЧ, вирус иммунодефицита обезьян, вирус кошачьего иммунодефицита являются примерами лентивирусов. Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая, в особенности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как предлагается у Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). К другим примерам лентивирусных векторов, которые могут использоваться в клинической практике, относится, помимо прочего, например, технология доставки генов LENTIVECTOR® от компании Oxford BioMedica, система векторов LENTIMAX™ от компании Lentigen и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

[592] Лентивирусные векторы обычно создаются в системе транзientной трансфекции, в которой линия клеток трансфицируется тремя отдельными системами экспрессии плазмид. К ним относятся плазида-вектор для переноса (части провируса ВИЧ), упаковочная плазида или конструкция и плазида с гетерологичным геном оболочки (*env*) другого вируса. Три плазмидных компонента вектора помещают в упаковывающую клетку, которую затем встраивают в оболочку ВИЧ. Вирусные части вектора содержат последовательности вставок, так что вирус не может реплицироваться внутри клеточной системы. Современные лентивирусные векторы третьего поколения кодируют только три из девяти белков ВИЧ-1 (*Gag*, *Pol*, *Rev*), которые экспрессируются из отдельных плазмид, чтобы избежать опосредованного рекомбинацией образования компетентного по репликации вируса. В лентивирусных векторах четвертого поколения ретровирусный геном был дополнительно сокращен (см., например, упаковочные системы TAKARA® LENTI-X™ четвертого поколения).

[593] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) спейсер 1, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4830 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный

домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[594] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) спейсер 11, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4840 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[595] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) спейсер 13, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4841 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[596] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) спейсер 14, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4842, и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[597] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088, (iii) спейсер 1, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4830, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt,

содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[598] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 15, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4843, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) 4-1BB костимулирующий домен, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[599] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 21, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4849, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[600] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 4, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4833, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) 4-1BB костимулирующий домен, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[601] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 5, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4834, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[602] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii)

спейсер 6, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4835, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[603] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 13, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4841, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[604] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 21, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4889, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[605] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер 28, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:4856, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO:4868, и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[606] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет от 35Å до 55Å. В

некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[607] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R12, содержащий SEQ ID NO: 4875; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет около 45 Å. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[608] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет от 180Å до 250Å. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[609] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv R11, содержащий SEQ ID NO: 5048; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет около 200 Å. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[610] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO:4818 или 5088, (iii)

спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет от 35 Å до 55 Å. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[611] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv 2A2, содержащий SEQ ID NO: 5047; (ii) линкер Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088, (iii) спейсер, полученный из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (iv) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4868 и необязательно (v) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4869, где общая длина линкера (ii) и спейсера (iii) составляет около 45 Å. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (vi) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4870; (vii) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4871; (viii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4872, или любую их комбинацию.

[612] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую CAR, содержащую, состоящую или по существу состоящую из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 5049-5063. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv FMC63, содержащий SEQ ID NO: 4866; (ii) спейсер 7, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4836, и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4877, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4878. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4879; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4880; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4881, или любую их комбинацию.

[613] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv FMC63, содержащий SEQ ID NO: 4866; (ii) спейсер 8, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4837 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4877, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4878. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4879; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO:

4880; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4881, или любую их комбинацию.

[614] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv FMC63, содержащий SEQ ID NO: 4866; (ii) спейсер 9, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4838 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4877, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4878. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4879; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4880; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4881, или любую их комбинацию.

[615] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv FMC63, содержащий SEQ ID NO: 4866; (ii) спейсер 10, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4939 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4877, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4878. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4879; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4880; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4881, или любую их комбинацию.

[616] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv FMC63, содержащий SEQ ID NO: 4866; (ii) спейсер 11, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4840 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4877, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4878. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4879; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4880; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4881, или любую их комбинацию.

[617] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv FMC63, содержащий SEQ ID NO: 4866; (ii) спейсер 14, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4842 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4877, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4878. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4879; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4880; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4881, или любую их комбинацию.

[618] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv FMC63, содержащий SEQ ID NO: 4866; (ii) спейсер 16, содержащий или состоящий из

SEQ ID NO: 4844 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4877, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4878. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4879; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4880; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4881, или любую их комбинацию.

[619] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv FMC63, содержащий SEQ ID NO: 4866; (ii) спейсер 28, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4856 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4877, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4878. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4879; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4880; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4881, или любую их комбинацию.

[620] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую: (i) scFv FMC63, содержащий SEQ ID NO: 4866; (ii) спейсер 28, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4856 и необязательно линкера Gly-Ser с SEQ ID NO: 4818 или 5088; (iii) трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 4877, и необязательно (iv) костимулирующий домен 4-1BB, содержащий SEQ ID NO: 4878. В некоторых аспектах лентивирусный вектор дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую (v) CD3z, содержащий SEQ ID NO: 4879; (vi) P2A, содержащий SEQ ID NO: 4880; (vii) EGFRt, содержащий SEQ ID NO: 4881, или любую их комбинацию.

[621] В некоторых аспектах невирусные способы можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, в клетку или ткань субъекта. В некоторых аспектах невирусный способ включает использование транспозона. В некоторых аспектах использование невирусного способа доставки позволяет перепрограммировать клетки, например, Т- или НК-клетки, и непосредственно вводить их субъекту. В некоторых аспектах последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, может быть встроена в геном клетки-мишени (например, Т-клетки) или клетки-хозяина (например, клетки для рекомбинантной экспрессии полипептида CAR) с использованием систем CRISPR/Cas и альтернативных версий генома, таких как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN) и мегануклеазы (MN).

[622] В некоторых случаях CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию) можно экспрессировать в клетке с использованием бицистронной или мультицистронные

векторы экспрессии. В некоторых аспектах бицистронные или мультицистронные векторы включают, но не ограничиваются ими, (1) несколько промоторов, слитых с открытыми рамками считывания нескольких CAR; (2) вставку сигналов сплайсинга между блоками CAR; гибриды CAR, экспрессия которых управляется одним промотором; (3) вставку сайтов протеолитического расщепления между единицами CAR (саморасщепляющийся пептид); и (iv) вставку внутренних сайтов посадки рибосом (IRES).

[623] В некоторых аспектах несколько единиц CAR экспрессируются в одной открытой рамке считывания (ORF), тем самым образуя один полипептид, содержащий несколько единиц CAR, где по меньшей мере один из CAR представляет собой CAR по настоящему изобретению. В некоторых аспектах аминокислотная последовательность или линкер, содержащий высокоэффективный сайт расщепления, расположены между каждой единицей CAR. В контексте данного документа термин «высокая эффективность расщепления» определяется как расщепление более 50%, более 70%, более 80% или более 90% транслируемого белка. Эффективность расщепления можно измерить с помощью вестерн-блоттинга.

[624] Неограничивающие примеры высокоэффективных сайтов расщепления включают 2A свиного тешовируса-1 (P2A), 2A FMDV (обозначаемый в данном документе F2A); 2A вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A); и 2A вируса *Thosea asigna* (T2A), 2A вируса цитоплазматического полиедроза (BmCPV2A) и 2A вируса инфекционной фляшерии (BmIFV2A) или их комбинацию. В некоторых аспектах высокоэффективным сайтом расщепления является P2A. Высокоэффективные сайты расщепления описаны в Kim et al. (2011) High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. PLoS ONE 6(4): e18556, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[625] В некоторых аспектах несколько единиц CAR экспрессируются в одной открытой рамке считывания (ORF), экспрессия находится под контролем сильного промотора.

[626] В некоторых аспектах вектор по настоящему изобретению дополнительно содержит вспомогательный ген. В некоторых аспектах вспомогательный ген представляет собой неиммуногенный инструмент селекции, маркер для отслеживания или суицидальный ген. В некоторых аспектах вспомогательный ген представляет собой укороченный ген EGFR (EGFRt). Пример укороченного гена EGFR (EGFRt), который можно использовать в соответствии с вариантами осуществления, описанными в данном документе, включает SEQ ID NO: 4872 (включает сигнальный пептид GMCSF, указанный в SEQ ID NO: 4865) или SEQ ID NO: 5064 (без сигнального пептида).

Модификации полинуклеотида

[627] В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их

комбинацию), может содержать по меньшей мере одно химически модифицированное азотистое основание, сахар, остов или любую их комбинацию. Таким образом, полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, может содержать одну или более модификаций. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, содержит по меньшей мере одиннуклеотидный аналог. В некоторых аспектах по меньшей мере один нуклеотидный аналог, введенный с помощью IVT (транскрипции *in vitro*) или химического синтеза, выбран из группы, состоящей из мономера 2'-О-метоксиэтил-РНК (2'-МОЕ-РНК), мономера 2'-фтор-ДНК, мономер 2'-О-алкил-РНК, мономера 2'-амино-ДНК, мономера закрытой нуклеиновой кислоты (LNA), мономера сEt, мономера сМОЕ, мономера 5'-Me-LNA, мономера 2'-(3-гидрокси)пропил-РНК, мономера арабинонуклеиновой кислоты (ANA), мономера 2'-фтор-ANA, мономера ангидрогекситолнуклеиновой кислоты (HNA), мономера интеркалирующей нуклеиновой кислоты (INA) и комбинации двух или более указанных нуклеотидных аналогов. В некоторых аспектах оптимизированная молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну модификацию остова, например, фосфоротиоатную межнуклеотидную связь.

[628] В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, может быть химически модифицирован в концевых положениях, например, путем введения модификаций М (2'-О-метил), MS (2'-О-метил-3'-фосфотиоат) или MSP (2'-О-метил-3'-тио-РАСЕ, фосфоноацетат) или их комбинации в положениях 1, 2, 3 относительно 5'- и/или 3'-концов.

[629] Модифицированные полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), не обязательно должны быть единообразно модифицированы по всей длине молекулы. Различные модификации нуклеотидов и/или структуры остова могут существовать в различных положениях в нуклеиновой кислоте. Специалисту в данной области техники будет понятно, что нуклеотидные аналоги или другие модификации могут быть расположены в любом(-ых) положении(-ях) нуклеиновой кислоты, таким образом функция нуклеиновой кислоты существенно не изменяется. Модификация также может представлять собой 5'- или 3'-концевую модификацию. Нуклеиновые кислоты могут иметь минимум один и максимум 100% модифицированных нуклеотидов или любое промежуточное процентное содержание, такое как по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% модифицированных нуклеотидов.

[630] В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему

изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), может включать модификации для предотвращения быстрой деградации эндо- и экзонуклеазами. Модификации включают, но не ограничиваются ими, например, (а) модификации концов, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, дефосфорилирование, конъюгация, инвертированные связи и т. д.), модификации 3'-конца (конъюгация, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи, и т. д.), (b) модификации оснований, например, замена модифицированными основаниями, стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями, или основаниями, которые образуют пары с расширенным набором партнеров, или конъюгированными основаниями, (с) модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара, а также (d) модификации межнуклеозидной связи, включая модификацию или замену фосфодизфирных связей.

[631] Конкретные примеры синтетических модифицированных полинуклеотидов, кодирующих CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), применимых в способах, описанных в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению, содержащие модифицированные или неприродные межнуклеозидные связи. Синтетические модифицированные полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению, имеющие модифицированные межнуклеозидные связи, включают, помимо прочего, те, которые не содержат атома фосфора в межнуклеозидной связи. В некоторых аспектах синтетический модифицированный полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, имеет атом фосфора в своей межнуклеозидной связи(-ях).

[632] Неограничивающие примеры модифицированных межнуклеозидных связей включают фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидаты и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, их Т-5'-связанные аналоги и те, которые имеют инвертированную полярность, причем смежные пары нуклеозидных звеньев связаны 3'-5' к 5'-3' или Т-5' до 5'-Т. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот.

[633] Модифицированные межнуклеозидные связи, которые не включают атом фосфора, имеют межнуклеозидные связи, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, или одной или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают имеющие морфолиновые связи (частично

образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метилен-формацетильные и тиоформацетильные остовы; алкен-содержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленимино- и метиленигидразино-остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие имеющие смешанные N, O, S и CH₂ компоненты.

[634] В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), можно оптимизировать по кодонам путем внесения одной или более замен синонимических кодонов. В контексте данного документа термины «оптимизация кодонов», «оптимизированные кодоны» и их грамматические варианты относятся к модификации первичной последовательности нуклеиновой кислоты путем замены синонимичных кодонов с целью повышения эффективности ее трансляции. Соответственно, оптимизация кодонов включает изменение кодонов, используемых в полинуклеотиде, кодирующем CAR по настоящему изобретению, без изменения аминокислотной последовательности, которую он кодирует, что, как правило, резко увеличивает количество белка, кодируемого кодон-оптимизированным геном, поскольку она, как правило, удаляет «редкие» кодоны и заменяет их избыточными кодонами или удаляет кодон с низкой скоростью пополнения тРНК кодоном с высокой скоростью пополнения тРНК. Такая оптимизация кодонов может, например, (i) улучшить выход белка при экспрессии рекомбинантного белка или (ii) улучшить стабильность, время полужизни или другое желаемое свойство мРНК или ДНК, кодирующей связывающую молекулу, описанную в данном документе, где такую мРНК или ДНК вводят нуждающемуся в этом субъекту.

[635] Последовательности полинуклеотидов, кодирующие CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), можно оптимизировать по кодонам с использованием любых способов, известных в данной области техники на момент подачи настоящей заявки.

[636] В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, то есть спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), был оптимизирован по последовательности. В контексте данного документа термин «оптимизированная последовательность» относится к модификации последовательности нуклеиновой кислоты для придания ей свойств, повышающих ее трансляционную эффективность, устранения свойств, снижающих ее трансляционную эффективность, или в целом улучшения свойств, связанных с эффективностью экспрессии после введения *in vivo*. Такие свойства включают, помимо прочего, улучшение стабильности нуклеиновых кислот (например, стабильности мРНК), повышение

эффективности трансляции в ткани-мишени, снижение количества экспрессируемых укороченных белков, улучшение фолдинга или предотвращение неправильного фолдинга экспрессируемых белков, снижение токсичности экспрессируемых продуктов, уменьшение гибели клеток, вызванной экспрессируемыми продуктами, или увеличение и/или уменьшение агрегации белка

[637] В настоящем изобретении рассматриваются модификации всей конструкции CAR, например, модификации одной или более аминокислотных последовательностей различных доменов конструкции CAR с целью создания функционально эквивалентных молекул. Конструкция CAR может быть модифицирована для сохранения по меньшей мере около 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности исходной конструкции CAR. В настоящем изобретении также рассматриваются модификации конкретных областей CAR, например, модификации в одной или более аминокислотных последовательностях одной или более CDR конструкции CAR для получения функционально эквивалентных молекул.

Клетки

[638] В настоящем изобретении также предложена генетически модифицированная клетка, содержащая полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию). В некоторых аспектах CAR рекомбинантно экспрессируется клеткой, генетически модифицированной для экспрессии CAR, при этом клетка содержит одну или более полинуклеотидных последовательностей или векторов, кодирующих CAR по настоящему изобретению.

[639] В некоторых аспектах генетически модифицированная клетка, описанная в данном документе, была трансфицирована полинуклеотидом или вектором, кодирующим CAR по настоящему изобретению. Термин «трансфицированный» (или эквивалентные термины «трансформированный» и «трансдуцированный») относится к процессу, посредством которого экзогенная нуклеиновая кислота, например, полинуклеотид или вектор, кодирующий CAR по настоящему изобретению, переносится или вводится в геном клетки-хозяина, например, Т-клетки. «Трансфицированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой, например, полинуклеотидом или вектором, кодирующим CAR по настоящему изобретению. Клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

[640] В некоторых аспектах клетку (например, Т-клетку) трансфицируют вектором по настоящему изобретению, например, вектором AAV или лентивирусным вектором. В некоторых таких аспектах клетка может стабильно экспрессировать CAR по настоящему изобретению.

[641] В некоторых аспектах клетку (например, Т-клетку) трансфицируют

нуклеиновой кислотой, например, мРНК, кДНК, ДНК, кодирующей CAR по настоящему изобретению. В некоторых таких аспектах клетка может транзистентно экспрессировать CAR по настоящему изобретению. Например, конструкция РНК может быть непосредственно трансфецирована в клетку. Способ получения мРНК для применения при трансфекции включает *in vitro* транскрипцию (IVT) матрицы с помощью специально разработанных праймеров с последующим добавлением поли(А) для получения конструкции, содержащей 3' и 5' нетранслируемую последовательность (UTR), 5'-кэп и/или участок внутренней посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, подлежащую экспрессии, и поли(А)-хвост, как правило, длиной 50-2000 оснований. Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные типы клеток. В некоторых аспектах матрица включает последовательности для CAR по настоящему изобретению. В одном аспекте вектор РНК CAR трансдуцируется в Т-клетку путем электропорации.

[642] В некоторых аспектах клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку. В контексте данного документа термин «иммунная эффекторная клетка» относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, например, в стимуляции иммунного эффекторного ответа. «Иммунная эффекторная функция» или «иммунный эффекторный ответ» относятся к функции или ответу, например, иммунной эффекторной клетки, которые усиливают или стимулируют иммунную атаку клетки-мишени. Например, иммунная эффекторная функция или ответ относится к свойству Т- или НК-клетки, которое способствует уничтожению или ингибированию роста или пролиферации клетки-мишени. В случае Т-клетки первичная стимуляция и костимуляция являются примерами иммунной эффекторной функции или ответа.

[643] Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторной функцией Т-клетки, например, может быть цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов. Внутриклеточный сигнальный домен CAR, имеющей может генерировать сигнал, который способствует иммунной эффекторной функции клетки, содержащей CAR, например, CART-клетки. Примеры иммунной эффекторной функции, например, в CART-клетке, включают цитолитическую активность и хелперную активность, включая секрецию цитокинов. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен представляет собой часть CAR, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя можно использовать целый внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях не обязательно использовать новую цепь. В случае применения усеченной части внутриклеточного сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо интактной цепи при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, это означает, что термин «внутриклеточный сигнальный домен» представляет собой включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

[644] В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен может содержать

первичный внутриклеточный сигнальный домен. К примерам первичных внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или стимуляцию, зависящую от антигена. Например, в случае CART первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность корецептора или костимулирующей молекулы.

[645] Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры ITAM, содержащие первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают, но не ограничиваются ими, полученные из CD3-дзета, FcR-гамма, общий FcR-гамма (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон Rib), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcεRI, CD66d, CD32, DAP10 и DAP12.

[646] Примеры иммунных эффекторных клеток включают, например, Т-клетки, например, альфа/бета-Т-клетки и гамма/дельта-Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры (NK), естественные Т-клетки-киллеры (NKT), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения. Врожденные лимфоидные клетки (ILC) представляют собой группу врожденных иммунных клеток, которые происходят от общего лимфоидного предшественника (CLP) и принадлежат к лимфоидной линии дифференцировки. Эти клетки определяются отсутствием антигенспецифического В- или Т-клеточного рецептора из-за отсутствия гена, активирующего рекомбинацию (RAG). ILC не экспрессируют маркеры миелоидных или дендритных клеток. ILC имеют различные физиологические функции; некоторые функции аналогичны Т-хелперам, при этом в группу входят также цитотоксические NK-клетки. Соответственно, в некоторых аспектах клетка, генетически модифицированная для экспрессии CAR по настоящему изобретению, представляет собой, например, Т-клетку, NK-клетку, NKT-клетку или ILC-клетку.

[647] Т-клетки можно получать из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань из места инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли.

Фармацевтические композиции

[648] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим композиции, описанные в данном документе, например, полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, или генетически модифицированную

клетку, содержащую полинуклеотид, или вектор, кодирующий CAR по настоящему изобретению, которые подходят для введения субъекту.

[649] Фармацевтические композиции, как правило, содержат полинуклеотид, вектор или клетку, кодирующие или содержащие CAR по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель в форме, подходящей для введения субъекту. Фармацевтически приемлемые наполнители или носители частично определяются конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения композиции.

[650] Существует множество подходящих составов фармацевтических композиций, содержащих CAR по настоящему изобретению (см. e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18th ed. (1990)). Фармацевтические композиции, как правило, изготавливаются в стерильной форме и полностью соответствуют всем требованиям надлежащей производственной практики (НПП) Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США.

[651] В некоторых аспектах фармацевтическую композицию вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых аспектах фармацевтическую композицию, содержащую CAR по настоящему изобретению, вводят до введения дополнительного(-их) терапевтического агента(-ов). В других аспектах фармацевтическую композицию, содержащую CAR по настоящему изобретению, вводят после введения дополнительного терапевтического агента(-ов). В дополнительных аспектах фармацевтическую композицию, содержащую CAR по настоящему изобретению, вводят одновременно с дополнительным(-и) терапевтическим агентом(-ами).

[652] Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов (*например*, животных или человека) при используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (*например*, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[653] Примеры носителей или разбавителей включают, помимо прочего, воду,

солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Применение таких сред и соединений для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо стандартные среды или соединения несовместимы с композициями по настоящему изобретению (например, полинуклеотиды, векторы или клетки), предполагается их применение в композициях.

VI. Библиотеки и методы применения

[654] В настоящем изобретении также предложены библиотеки, содержащие шарниры Ig, их фрагменты и их комбинации (например, два или более соединенных фрагментов шарниров Ig). Библиотеки по настоящему изобретению можно подвергать скринингу для выявления полипептидов оптимальной длины и состава для применения в качестве спейсера CAR, т.е. спейсера, который приводит к созданию CAR с повышенной активностью по отношению к соответствующему CAR, содержащему эталонный спейсер (например, спейсер, содержащий шарнир IgG1).

[655] В некоторых аспектах библиотеки спейсеров могут быть созданы путем соединения фрагментов шарниров иммуноглобулина, описанных в данном документе (см. описание модульных спейсеров выше). Схематическое изображение небольшой библиотеки, созданной из модулей IgG3, представлено на **Фиг. 8**. В некоторых аспектах библиотека спейсеров по настоящему изобретению содержит спейсеры 1-31, показанные на **Фиг. 9**. В некоторых аспектах библиотека спейсеров по настоящему изобретению содержит спейсеры 1-31, показанные на **Фиг. 9** и/или их варианты, например, спейсеры, соответствующие спейсерам 1-31, дополнительно содержащие гибкий линкер, например, гибкий линкер SEQ ID NO: 4818 или 5088, связанный с N-концом и/или C-концом аминокислотной последовательности из спейсера 1 - спейсера 31, как показано на **Фиг. 9**.

[656] В настоящем изобретении также предложены библиотеки CAR, содержащие, например, варианты CAR, в которых спейсер заменен спейсером из библиотеки спейсеров по настоящему изобретению (например, библиотеки, содержащей спейсеры, описанные на **Фиг. 9**, или их варианты). Также предложены библиотеки CAR, содержащие, например, варианты CAR, содержащие спейсер, описанный в данном документе (например, спейсер, описанный на **Фиг. 9**), в котором заменены другие компоненты CAR, например, сигнальный пептид, связывающий (например, scFv), трансмембранный домен, костимулирующий домен, сигнальный домен или любую их комбинацию.

VII. Показания

[657] В некоторых аспектах композиции, описанные в данном документе (например, полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению, векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению, CAR по настоящему изобретению, или клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, например, CART-клетки) можно использовать для лечения заболевания или патологического состояния, например, пролиферативного заболевания, например, злокачественной опухоли или рака, или предракового состояния, такого как

миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз.

[658] Термин «злокачественное новообразование» относится к широкой группе разных пролиферативных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом патологических клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани и также могут метастазировать в отдаленные части тела по лимфатической системе или кровотоку. В контексте данного документа термин «пролиферативное» нарушение или заболевание относится к нежелательной клеточной пролиферации одной или более субпопуляций клеток в многоклеточном организме, что приводит к повреждению (т.е. дискомфорту или снижению продолжительности жизни) многоклеточного организма. Например, в контексте данного документа пролиферативное нарушение или заболевание включает неопластические нарушения и другие пролиферативные нарушения. В контексте данного документа термин «неопластический» относится к любой форме дисрегулированного или нерегулируемого роста клеток, независимо от злокачественности или доброкачественности, что приводит к аномальному росту ткани. Таким образом, «неопластические клетки» включают злокачественные и доброкачественные клетки, характеризующиеся разрегулированным или нерегулируемым клеточным ростом. В некоторых аспектах злокачественное новообразование представляет собой опухоль. Термин «опухоль», используемый в данном документе, относится ко всем видам роста и пролиферации опухолевой клетки, будь то злокачественный или доброкачественный, и всем предраковым и раковым клеткам и тканям.

[659] В некоторых аспектах заболевание представляет собой солидную опухоль или гемобластоз. В некоторых аспектах злокачественное заболевание представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых аспектах заболевание представляет собой гемобластоз. В некоторых аспектах гемобластоз представляет собой лейкоз. В некоторых аспектах злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из одного или более острых лейкозов, включая, помимо прочего, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз (BALL), Т-клеточный острый лимфолейкоз (TALL), малый лимфоцитарный лейкоз (SLL), острый лимфоидный лейкоз (ALL) (например, рецидивирующий и рефрактерный ALL); один или более хронических лейкозов, включая, помимо прочего, хронический миелогенный лейкоз (CML) и хронический лимфолейкоз (CLL). Дополнительные гемобластозы или гематологические заболевания включают, но не ограничиваются этим, мантийно-клеточную лимфому (MCL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, бластное новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому, лимфому маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток,

макроглобулинемию Вальденстрема и предлейкоз. Предлейкоз охватывает разнообразный набор гематологических заболеваний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови. В некоторых аспектах показание представляет собой атипичную и/или неклассическую злокачественную опухоль, злокачественное новообразование, предраковое состояние или пролиферативное заболевание; и любую их комбинацию.

[660] В некоторых аспектах заболевание представляет собой лимфому, например, MCL или лимфому Ходжкина. В некоторых аспектах заболевание представляет собой лейкоз, например, SLL, CLL и/или ALL. В некоторых аспектах заболевание, ассоциированное с опухолевым антигеном, например, опухолевым антигеном, описанным в данном документе, выбрано из пролиферативного заболевания, такого как злокачественная опухоль или злокачественное новообразование, или предракового состояния, такого как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз, или не связанного со злокачественным новообразованием показания, связанного с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе. В некоторых аспектах заболевание, ассоциированное с опухолевым антигеном, описанным в данном документе, представляет собой солидную опухоль, например, солидную опухоль, описанную в данном документе, например, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, шейки матки, желудка, яичников, головы или легкого.

[661] В некоторых аспектах злокачественное новообразование выбрано из AML, ALL, B-ALL, T-ALL, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, CML, волосатоклеточного лейкоза, лимфомы Ходжкина, болезни тучных клеток, миелодиспластического синдрома, миелопролиферативного новообразования, плазмноклеточной миеломы, новообразования из плазмацитоидных дендритных клеток или их комбинации.

[662] В некоторых аспектах композиции, описанные в данном документе (например, полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению, векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению, CAR по настоящему изобретению, или клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, например, CART-клетки), применяют для снижения или уменьшения размера опухоли или ингибирования роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых аспектах опухоль представляет собой карциному (т.е. злокачественное новообразование эпителиального происхождения). В некоторых аспектах опухоль выбрана, например, из группы, состоящей из рака желудка, рака желудочно-пищеводного перехода (GEJ), рака пищевода, колоректального рака, рака печени (гепатоцеллюлярной карциномы, HCC), рака яичников, рака молочной железы, NSCLC, рака мочевого пузыря, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, лимфомы, рака матки, рака почки, рака желчевыводящих путей, рака предстательной железы, рака яичек, рака уретры, рака полового члена, рака грудной клетки, рака прямой кишки, рака головного мозга (глиомы и глиобластомы), рака шейки матки, рака околоушной железы, рака

гортани, рака щитовидной железы, аденокарцином, нейробластом, меланомы и карциномы из клеток Меркеля.

[663] «Злокачественное новообразование» или «раковая ткань» может включать опухоль на различных стадиях. В некоторых аспектах злокачественное новообразование или опухоль представляют собой злокачественное новообразование или опухоль стадии 0, так что, например, злокачественное новообразование или опухоль находятся на очень ранней стадии развития и не имеют метастазов. В некоторых аспектах злокачественное новообразование или опухоль представляют собой злокачественное новообразование или опухоль стадии I, так что, например, злокачественное новообразование или опухоль имеют относительно небольшой размер, не распространяются на близлежащие ткани и не метастазируют. В других аспектах злокачественное новообразование или опухоль представляют собой злокачественное новообразование или опухоль стадии II или стадии III, так что, например, злокачественное новообразование или опухоль больше, чем на стадии 0 или стадии I, и они проросли в соседние ткани, но не метастазировали, за исключением потенциального метастазирования в лимфатические узлы. В других аспектах злокачественное новообразование или опухоль представляют собой злокачественное новообразование или опухоль стадии IV, так что, например, представляют собой злокачественное новообразование или опухоль имеют метастазы. Стадию IV также можно назвать запущенным или метастатическим злокачественным новообразованием.

[664] В некоторых аспектах злокачественное новообразование может включать, но не ограничивается этим, рак коры надпочечников, распространенное злокачественное новообразование, рак анального канала, апластическую анемию, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, метастазы в кости, опухоли головного мозга, рак головного мозга, рак молочной железы, детский рак, злокачественное новообразование неизвестной первичной локализации, болезнь Кастлемана, рак шейки матки, рак толстой/прямой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, опухоли семейства Юинга, рак глаза, рак желчного пузыря, карциноидные опухоли желудочно-кишечного тракта, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, гестационную трофобластическую болезнь, болезнь Ходжкина, саркому Капоши, почечно-клеточную карциному, рак гортани и гортаноглотки, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, карциноидную опухоль легкого, лимфому кожи, злокачественную мезотелиому, множественную миелому, миелодиспластический синдром, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, рак полости рта и ротоглотки, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак полового члена, опухоль гипофиза, рак предстательной железы, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому мягких тканей у взрослых, базальноклеточный и плоскоклеточный рак кожи, меланому, рак тонкой кишки, рак

желудка, рак яичек, рак горла, рак тимуса, рак щитовидной железы, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема, опухоль Вильмса и вторичные злокачественные новообразования, вызванные лечением рака.

[665] В некоторых аспектах опухоль представляет собой солидную опухоль. «Солидная опухоль» включает, но не ограничивается ими, саркому, меланому, карциному или другую солидную опухоль. «Саркома» относится к опухоли, которая состоит из субстанции, подобной эмбриональной соединительной ткани, и, как правило, состоит из плотно упакованных клеток, встроенных в фибриллярную или гомогенную субстанцию. Саркомы включают, но не ограничиваются этим, хондросаркому, фибросаркому, лимфосаркому, меланосаркому, миксосаркому, остеосаркому, саркому Абемети, инфильтрирующую липому, липосаркому, альвеолярную саркому мягких тканей, амелобластосаркому, ботриоидную саркому, хлорлейкоз, хориокарциному, эмбриональную саркому, саркому опухоли Вильмса, саркому эндометрия, стромальную саркому, саркому Юинга, фасциальную саркому, фибробластическую саркому, гигантоклеточную саркому, гранулоцитарную саркому, саркому Ходжкина, идиопатическую множественную геморрагическую саркому, иммунобластную саркому В-клеток, лимфому, иммунобластную саркому Т-клеток, саркому Дженсена, саркому Капоши, саркому Купфера, ангиосаркому, лейкосаркому, злокачественную мезенхимому, паростальную саркому, ретикулоцитарную саркому, саркому Рауса, саркому серозной кисты, синовиальную саркому или телеангиэктальтическую саркому.

[666] Термин «меланома» относится к опухоли, возникающей из меланоцитарной системы кожи и других органов. Меланомы включают, но не ограничиваются этим, акрально-лентигозную меланому, амеланотическую меланому, доброкачественную ювенильную меланому, меланому Клаудмана, меланому S91, меланому Хардинга-Пасси, ювенильную меланому, меланому типа злокачественного лентиго, злокачественную меланому, метастатическую меланому, узловую меланому, подногтевую меланому или поверхностную распространяющуюся меланому.

[667] Термин «карцинома» относится к злокачественному новообразованию, состоящему из эпителиальных клеток, склонных проникать в окружающие ткани и вызывать метастазы. Иллюстративные карциномы включают, например, ацинарную аденокарциному, аденокарциному, аденокистозную карциному, аденоидо-кистозную карциному, аденоматозную карциному, карциному коры надпочечника, альвеолярную карциному, аденоматоз легкого, базальноклеточную карциному, базально-клеточную карциному, базалоидную карциному, базоспиноцеллюлярную карциному, бронхоальвеолярную карциному, бронхиолярную карциному, бронхогенную карциному, мозговидную карциному, холангиоцеллюлярный рак, хориокарциному, перстневидно-клеточный рак, комедонную карциному, карциному тела, решетчатую карциному, распространенную карциному плевры, рак кожи, цилиндрическую карциному, протоковую карциному, карциному из эпителия протоков, твердую карциному, эмбриональный рак, медуллярную карциному, эпидермоидную карциному, карциному из

эпителия аденоидов, экзофитную карциному, рак из язвы, фиброзную карциному, слизеподобную карциному, слизеобразующий рак, гигантоклеточную карциному, карциному из гигантских клеток, ацинарную аденокарциному, гранулезоклеточную опухоль, базально-клеточный рак, гематоидную карциному, злокачественную карциному, аденому из клеток Гюртле, гиалоидную карциному, гипернефроидную карциному, детскую тератокарциному, внутриэпителиальный рак, внутриэпидермальную карциному, внутриэпителиальный рак, карциному Кромпечера, карциному из клеток Кульчицкого, крупноклеточный рак, чечевицеобразную карциному, хрусталиковую карциному, липоматозную карциному, лобулярную карциному, лимфоэпителиальную карциному, медуллярную карциному, костномозговую карциному, меланотическую карциному, карциному неба, слизеобразующий рак, слизеобразующую карциному, карциному слизистой, слизеобразующий плоскоклеточный рак, муцинозную карциному, карциному слизистой, миксоматозную карциному, носоглоточную карциному, овсяно-клеточный рак, оссифицирующую карциному, остеоидную карциному, папиллярную карциному, околопортальную карциному, преинвазивный рак, карциному из щипцовых клеток, флегмонозную карциному, светлоклеточный рак почки, карциному из резервных клеток, саркомоподобный рак, карциному слизистой носа, фиброкарциному, карциному мошонки, слизистый рак, недифференцированный рак, мелкоклеточный рак, соленоидную карциному, рак из сферических клеток, псевдосаркому, губчатый рак, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак, нитевидную карциному, карциному гемангиому, карциному из гладких мышечных волокон и сосудистой ткани, переходно-клеточную карциному, бугристую карциному, тубулярный рак, туберозную карциному, веррукозную карциному или ворсинчатую карциному.

[668] Дополнительные злокачественные новообразования, которые можно лечить композициями, описанными в данном документе, (например, полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению, векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие CAR по настоящему изобретению, CAR по настоящему изобретению, или клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, например, CART-клетки) включают, например, лейкоз, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, нейробластому, рак молочной железы, рак яичников, рак легкого, рабдомиосаркому, первичный тромбоцитоз, первичную макроглобулинемию, мелкоклеточные опухоли легкого, первичные опухоли головного мозга, рак желудка, рак толстой кишки, злокачественную инсулиному поджелудочной железы, злокачественный карциноид, рак мочевого пузыря, предраковые поражения кожи, рак яичка, лимфому, рак щитовидной железы, папиллярный рак щитовидной железы, нейробластому, нейроэндокринный рак, рак пищевода, рак мочеполового тракта, злокачественную гиперкальциемию, рак шейки матки, рак эндометрия, рак коры надпочечников, рак предстательной железы, рак Мюллера, рак яичников, рак брюшины, рак маточной трубы или папиллярно-серозную карциному матки.

Способы

[669] В настоящем изобретении также предложены способы применения CAR и экспрессирующих CAR клеток по настоящему изобретению для адоптивной терапии. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ стимуляции опосредованного T-клетками иммунного ответа на популяцию клеток-мишеней или ткань у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клеток, экспрессирующих CAR по настоящему изобретению. Также предложен способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клеток, экспрессирующих CAR по настоящему изобретению.

[670] В описании также предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества клеток, экспрессирующих CAR по настоящему изобретению. В описании также предложен способ получения популяции клеток, например, CART-клетки для терапии, включающей трансдукцию популяции клеток, выделенных от субъекта, полинуклеотидом или вектором по настоящему изобретению. В некоторых аспектах трансдукция включает культивирование клетки в подходящих условиях.

[671] В описании также предложен способ получения персистирующей популяции генетически сконструированных клеток у субъекта, у которого диагностировано злокачественное новообразование, причем способ включает введение субъекту клетки, генетически сконструированной для экспрессии CAR по настоящему изобретению.

[672] В изобретении также предложен способ увеличения популяции генетически сконструированных клеток (например, T-клеток) у субъекта, у которого диагностировано рака, причем способ включает введение субъекту клетки (например, T-клетки), генетически сконструированной для экспрессии CAR по настоящему изобретению. В некоторых аспектах клетка представляет собой T-клетку, например, аутологичную T-клетку. В других аспектах T-клетка представляет собой гетерологичную T-клетку. В некоторых аспектах описанных в данном документе способов субъектом является человек.

[673] В настоящем изобретении также предложен способ улучшения одного или более свойств CAR-терапии, включающий вставку спейсера CAR по настоящему изобретению между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом CAR, при этом спейсер расположен между лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом.

[674] В некоторых аспектах одним или более улучшенными свойствами CAR-терапии является повышенная секреция одного или более цитокинов. В некоторых аспектах секреция цитокинов, индуцированная CAR по настоящему изобретению, то есть CAR, содержащим спейсер CAR по настоящему изобретению, увеличивается по сравнению с секрецией, наблюдаемой после вставки соответствующего CAR, содержащего эталонный спейсер, например, шарнирный спейсер IgG1. В некоторых аспектах цитокин представляет собой интерлейкин, например, интерлейкин-2. В

некоторых аспектах цитокин представляет собой интерферон, например, интерферон-гамма.

[675] В некоторых аспектах введение CAR по настоящему изобретению приводит к увеличению секреции интерлейкина (например, интерлейкина-2) на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 100% по сравнению с секрецией интерлейкина, наблюдаемой после введения соответствующего CAR, содержащего эталонный спейсер, например, шарнирный спейсер CAR IgG1 или «короткий» эталонный спейсер (SEQ ID NO:4911), вместо спейсера CAR по настоящему изобретению.

[676] В некоторых аспектах введение CAR по настоящему изобретению приводит к увеличению секреции интерферона (например, интерферона-гамма) на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 100% по сравнению с секрецией интерферона (например, интерферона-гамма), наблюдаемой после введения соответствующего CAR, содержащего эталонный спейсер, например, шарнирный спейсер CAR IgG1 или «короткий» эталонный спейсер (SEQ ID NO:4911), вместо спейсера CAR по настоящему изобретению.

[677] В некоторых аспектах введение CAR по настоящему изобретению приводит к увеличению секреции TNF α на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 100% по сравнению с секрецией TNF α , наблюдаемой после введения соответствующего CAR, содержащего эталонный спейсер, например, шарнирный спейсер CAR IgG1 или «короткий» эталонный спейсер (SEQ ID NO:4911), вместо спейсера CAR по настоящему изобретению.

[678] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ выбора оптимального спейсера CAR, включающий сравнение кинетики уничтожения (площадь под кривой) и продукции цитокина (например, IL-2 и/или IFN γ) для библиотеки CAR,

различающихся используемым спейсером (например, спейсер представляет собой спейсер из библиотеки, представленной на **Фиг. 9**, или любой спейсер, описанный в данном документе), и выбор CAR с наименьшим AUC и/или с/или высокой продукцией цитокинов. Также предложен способ оптимизации или улучшения CAR, включающий замену исходного спейсера CAR спейсером, описанным в данном документе (например, спейсером из библиотеки, представленной на **Фиг. 9**, или любым спейсером, раскрытым в данном документе), сравнением кинетики уничтожения (площадь под кривой) и продукцию цитокинов (например, IL-2 и/или IFN γ), и выбор CAR с самой низкой AUC и/или самой высокой продукцией цитокинов.

[679] В настоящем изобретении также предложен способ выбора оптимального спейсера, включающий создание библиотеки CAR, отличающихся используемым спейсером (например, спейсер представляет собой спейсер из библиотеки, представленной на **Фиг. 9**, или любой спейсер, описанный в данном документе), и выполнение последовательных экспериментов по уничтожению, в которых CAR-T-клетки постоянно пассируют с новыми клетками-мишенями до тех пор, пока T-клетки CAR не перестанут пролиферировать и уничтожать. Лучшими спейсерами CAR будут те, которые присутствуют в CAR-T-клетках, которые будут иметь более продолжительную пролиферацию и активность уничтожения.

[680] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, вектору, CAR, композиции, набору, клетке или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, вектору, CAR, композиции, набору, клетке или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, вектору, CAR, композиции, набору, клетке или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к применению полинуклеотида, вектора, CAR, композиции, набора, клетки или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для производства лекарственного препарата. В некоторых аспектах настоящее изобретение обеспечивает применение полинуклеотида, вектора, CAR, композиции, набора, клетки или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для производства лекарственного препарата для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

[681] Настоящее изобретение также обеспечивает композицию, содержащую полинуклеотид, кодирующий CAR, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий CAR, или генетически модифицированную клетку, содержащую полинуклеотид, или вектор, кодирующий CAR, для лечения субъекта, нуждающегося в CAR-терапии. Настоящее изобретение также обеспечивает композицию, содержащую полинуклеотид, кодирующий CAR, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий CAR, или

генетически модифицированную клетку, содержащую полинуклеотид, или вектор, кодирующий CAR, для применения в качестве лекарственного препарата. Также предложена композиция, содержащая полинуклеотид, кодирующий CAR, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий CAR, или генетически модифицированная клетка, содержащая полинуклеотид или вектор, кодирующий CAR, для применения в качестве лечения рака у субъекта, нуждающегося в CAR-терапии. Также предложена композиция, содержащая полинуклеотид, кодирующий CAR, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий CAR, или генетически модифицированная клетка, содержащая полинуклеотид, или вектор, кодирующий CAR, для производство лекарственного препарата для лечения рака у субъекта, нуждающегося в CAR-терапии.

Наборы

[682] В настоящем изобретении также предложены наборы или промышленные изделия, содержащие (i) CAR по настоящему изобретению (т. е. CAR, содержащий спейсер CAR по настоящему изобретению, т. е. спейсер CAR, полученный из шарнира, спейсер CAR, полученный из петли, или их комбинацию), один или более полинуклеотидов, кодирующих CAR по настоящему изобретению, один или более векторов, кодирующих CAR по настоящему изобретению, или композицию, содержащую полинуклеотид(-ы) или вектор(-ы), и необязательно (ii) инструкции по применению, например, инструкции по применению в соответствии со способами, описанными в данном документе.

[683] В изобретении также предложены наборы, содержащие (i) клетку, генетически модифицированную для экспрессии CAR по настоящему изобретению, т. е. клетку с одним или более полинуклеотидами, кодирующими CAR по настоящему изобретению, или один или более векторов, кодирующих CAR по настоящему изобретению, (например, Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK), естественную Т-клетку-киллер (NKT) или ILC-клетку) или фармацевтическую композицию, содержащую эту клетку, и необязательно (ii) инструкции по применению.

[684] В некоторых аспектах набор или промышленное изделие содержит по меньшей мере полинуклеотид или вектор, кодирующий CAR по настоящему изобретению, клетку, генетически модифицированную для экспрессии CAR по настоящему изобретению, или композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую полинуклеотид, вектор или клетку, описанные в данном документе, в одном или более контейнерах.

[685] В некоторых аспектах набор или промышленное изделие содержит по меньшей мере полинуклеотид или вектор, кодирующий CAR по настоящему изобретению, клетку, генетически модифицированную для экспрессии CAR по настоящему изобретению, или композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую полинуклеотид, вектор или клетку, описанные в данном документе, и, необязательно, брошюру.

[686] Специалисты в данной области могут легко понять, что полинуклеотиды,

векторы, клетки и композиции по настоящему изобретению, фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотиды, векторы или клетки по настоящему изобретению или их комбинации, могут быть легко включены в одну из стандартных форматов наборов, хорошо известных в данной области техники.

[687] В некоторых аспектах набор или промышленное изделие содержит, например, полинуклеотид или вектор, кодирующий CAR по настоящему изобретению, или композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую полинуклеотид, вектор в сухой форме в контейнере (например, стеклянном флаконе), и, необязательно, флакон с растворителем.

[688] В некоторых аспектах набор или промышленное изделие содержит, например, полинуклеотид или вектор, кодирующий CAR по настоящему изобретению, или композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую полинуклеотид, вектор, по меньшей мере в одном контейнере и еще один или более контейнеров с реагентами для трансфекции.

[689] В практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning, Volumes I and II*; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al., патент США № 4683195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooke, *Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications*, 2nd Ed. CRC Press (2007), и Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[690] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

Примеры

Материалы и способы

[691] Для измерения экспрессии CAR и эффективности трансдукции примерно $0,5 \times 10^6$ клеток осаждали после 6-дневного культивирования после трансдукции для

анализа методом проточной цитометрии. Клетки ресуспендировали в фиксирующем красителе для определения жизнеспособности eFluor780 (Invitrogen, кат. № 65-0865-14) в PBS в течение 10 минут, затем промывали буфером для окрашивания клеток (BioLegend, кат. № 420201).

[692] Поверхностную экспрессию scFv CAR FMC63 детектировали с использованием анти-ID-AF647 (Lyell), разбавленного 1:2000 в буфере для окрашивания клеток. Эффективность трансдукции определяли путем окрашивания поверхности на маркер трансдукции EGFRt с использованием анти-hEGFR-BV421 (BioLegend, кат. № 352911), разбавленного 1:40 в буфере для окрашивания клеток. Клетки осаждали после 20-минутной инкубации в темноте с последующей двукратной промывкой буфером для окрашивания клеток. Весь анализ методом проточной цитометрии выполняли на анализаторе клеток ZE5 (Biorad) и анализировали с помощью FlowJo (Tree Star).

[693] Поверхностную экспрессию scFv CAR к Her определяли с использованием белка L-биотина (Thermo Scientific, кат. № 29997), разбавленного 1:6000 в буфере для окрашивания клеток, а затем стрептавидин-BV421 (BioLegend, кат. № 405226), разбавленного 1:400 в буфере для окрашивания клеток. Эффективность трансдукции определяли путем окрашивания поверхности на маркер трансдукции EGFRt с использованием анти-hEGFR-PE (BioLegend, кат. № 252903), разбавленного 1:40 в буфере для окрашивания клеток.

[694] Поверхностную экспрессию scFv CAR R11, R12 и 2A2 определяли с использованием hROR1-Fc-AF647 (Lyell), разбавленного 1:50 в буфере для окрашивания клеток. Эффективность трансдукции определяли путем окрашивания поверхности на маркер трансдукции EGFRt с использованием анти-hEGFR-PE (BioLegend, кат. № 252903), разбавленного 1:40 в буфере для окрашивания клеток.

Пример 1

Спейсер-зависимая активность Т-клеток с CAR к ROR1

[695] В этом исследовании описывается влияние различных спейсеров на индукцию аутоактивации, а также высвобождение ROR1-направленных цитокинов и активность Т-клеток, экспрессирующих CAR R12. Эталонная последовательность CAR, используемая для тестирования различных длин спейсеров и составляющих их элементов, показана в Таблице 20 ниже.

[696] В описанных в данном документе экспериментах использовали короткие, средние и длинные эталонные спейсеры. «Короткий» эталонный спейсер представляет собой спейсер, полученный из шарнира IgG4, с SEQ ID NO: 4911. «Средний» эталонный спейсер представляет собой спейсер, полученный из шарнира IgG4, с SEQ ID NO:4912. «Длинный» эталонный спейсер представляет собой спейсер, полученный из шарнира IgG4, с SEQ ID NO: 4913.

Таблица 20: Эталонные последовательности CAR R12

<p>CAR R12 с коротким эталонным спейсером CAR против ROR1 SEQ ID NO:5070</p>

SEQ ID NO	Описание
5070	Полная последовательность/840АК
4874	Сигнальный пептид/20АК/АК 1-20
4875	scFv/248АК/АК 21-268
4867	Спейсер/12АК/АК 269-280
4868	Трансмембранный домен/28АК/АК 281-308
4869	Костимулирующий домен 4-1ВВ/42 АК/309-350 АК
4870	CD3z/112АК/АК 351-462
4871	P2A/21АК/АК 463-483
4872	EGFRt/ 357АК/АК 484-840 (включает сигнальный пептид, указанный в SEQ ID NO:4865; 22АК/АК 484-505)

CAR R12 с коротким эталонным спейсером CAR к ROR1 с дополнительным линкером

SEQ ID NO:5071

SEQ ID NO	Описание
5071	Полная последовательность/845АК
4874	Сигнальный пептид/20АК/АК 1-20
4875	scFv/248АК/АК 21-268
4818	Необязательный линкер GGGSG/АК 269-273
4867	Спейсер/12АК/АК 274-285
4868	Трансмембранный домен/28АК/АК 286-313
4869	Костимулирующий домен 4-1ВВ/42 АК/314-355 АК
4870	CD3z/112АК/АК 356-467
4871	P2A/21АК/АК 468-488
4872	EGFRt/357АК/АК 489-845

[697] **Способы:** Все анализы проводили в среде RPMI1640, не содержащей цитокинов, с добавлением 10% FBS (среда для анализа клеток). Линии клеток H1975, Jeko1, Nalm6, Raji, A549 и T47D были приобретены в ATCC. Для облегчения визуализации клеток-мишеней с помощью системы визуализации для анализа живых клеток IncuCyte, эти линии клеток были стабильно помечены ядерным mKate2 путем лентивирусной трансдукции реагентом IncuCyte NuLight Red Lentivirus (Sartorius). Значения площади под кривой (AUC) рассчитывали путем интегрирования площади под нормализованными кривыми уничтожения клеток-мишеней.

[698] **Конструкции экспрессии:** лентивирусные конструкции были получены с бицистронными кассетами экспрессии. Кодировочные последовательности для (i) ROR1-

специфического CAR R12, (ii) саморасщепляющегося пептида P2A и (iii) EGFRt (усеченный EGFR, имеющий только домены III и IV и трансмембранный домен; SEQ ID NO:4868) были соединены в рамке считывания и помещены под контроль промотора MND. CAR R12 был получен из антитела R12 к ROR1 (Yang et al., PLoS One. (2011) 6:e21018) и содержал один из указанных спейсеров, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующий домен 4-1BB, и сигнальный домен CD3-дзета.

[699] *Оценка длины спейсера:* по возможности длину спейсера измеряли по кристаллическим структурам, доступным в RCSB PDB (база данных белковых структур; <http://www.rcsb.org>) с использованием инструмента измерения в программном обеспечении для молекулярной визуализации (например, PyMOL). Остатки с неразрешенными кристаллографическими координатами, последовательные сегменты с отсутствующей плотностью или спейсеры, для которых нет общедоступных кристаллических структур, были смоделированы как вытянутые структуры с каждым остатком, охватывающим 3,6 Å, расстояние N_i-N_{i+1} в β -конформации.

[700] *Культура клеток и лентивирусная трансдукция:* предварительно отобранные, криоконсервированные первичные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки человека от нормальных доноров были получены от Bloodworks (Сиэтл, штат Вашингтон). Т-клетки человека культивировали в среде OpTmizer (Thermo Fisher), дополненной заменителем сыворотки для иммунных клеток (Thermo Fisher), 2 mM L-глутамина (Gibco), 2 mM глутамакса (Gibco), 200 ME/мл IL-2 (R&D systems), 120 ME/мл IL-7 (R&D Systems) и 20 ME/мл IL-15 (R&D Systems). Для лентивирусной трансдукции Т-клетки стимулировали разведением 1:100 T-cell TransAct (Miltenyi) в течение 30 часов. Затем к Т-клеткам добавляли вирус на 24 часа. Затем стимуляцию и вирусную инфекцию прекращали добавлением 7 объемов свежей среды без TransAct, и клетки культивировали в течение 7 дополнительных дней в планшете Grex-24 (Wilson Wolf) перед криоконсервацией в CryoStor CS10 (STEMCELL Technologies) в концентрации 3×10^7 клеток/мл. Все свежеразмороженные Т-клетки нормализовали по %CAR⁺ и общему количеству Т-клеток путем добавления контрольных (нетрансдуцированных) Т-клеток к соответствующим образцам перед постановкой анализа.

[701] *Измерение экспрессии CAR с помощью проточной цитометрии:* для измерения уровней экспрессии CAR и эффективности трансдукции примерно $0,5 \times 10^6$ клеток осаждали после 6-дневного периода продукции после лентивирусной трансдукции для анализа методом проточной цитометрией. Клетки ресуспендировали в фиксирующем красителе для определения жизнеспособности eFluor780 (Invitrogen, кат. № 65-0865-14) в PBS в течение 10 минут, затем промывали буфером для окрашивания клеток (BioLegend, кат. № 420201).

[702] Поверхностную экспрессию scFv CAR R12 детектировали с использованием рекомбинантного химерного белка ROR1-Fc человека (R&D, кат. № 9490-RO-050), предварительно меченного набором для мечения антител DyLightTM 650 Microscale (ThermoFisher, кат. № 84536), разбавленным 1:500 в буфере для окрашивания клеток.

Эффективность трансдукции определяли путем окрашивания поверхности на маркер трансдукции EGFRt с использованием анти-hEGFR-BV421 (BioLegend, кат. № 352911), разбавленного 1:40 в буфере для окрашивания клеток. Клетки осаждали после 20-минутной инкубации в темноте с последующей 2-кратной промывкой буфером для окрашивания клеток. Весь анализ методом проточной цитометрии выполняли на анализаторе клеток ZE5 (Biorad) и анализировали с помощью FlowJo (Tree Star).

[703] *Постановка анализа - независимая от мишени секреция цитокинов:* криоконсервированные трансдуцированные первичные Т-клетки, экспрессирующие CAR R12 с указанными спейсерами, размораживали, подсчитывали и ресуспендировали до плотности клеток, равной $0,5 \times 10^6$ клеток CAR+/мл в среде для анализа клеток. Объем 100 мкл или 50000 CAR+ клеток добавляли в плоскодонный 96-луночный планшет и инкубировали в инкубаторе при 37°C. Через 24 часа образцы супернатантов из каждой лунки собирали для измерения IFN γ в соответствии с протоколом производителя (Meso Scale Discovery).

[704] *Постановка анализа - секреция цитокинов, зависящая от мишени:* криоконсервированные, трансдуцированные первичные Т-клетки, экспрессирующие CAR R12 с указанными спейсерами, размораживали, подсчитывали, ресуспендировали до плотности клеток, равной $0,5 \times 10^6$ CAR+ клеток/мл в среде для анализа клеток, а объем 100 мкл или 50000 CAR+ клеток добавляли в плоскодонный 96-луночный планшет, содержащий 50000 клеток H1975, и инкубировали при 37°C в системе для анализа живых клеток IncuCyte (Sartorius). Каждую лунку визуализировали каждые 4 часа для количественного определения количества клеток H1975 для оценки кинетики цитотоксичности Т-клеток. Через 24 часа супернатант из каждой лунки собирали для измерения IL-2 и IFN γ в соответствии с протоколом производителя (Meso Scale Discovery). Лизис клеток-мишеней отслеживали в течение 4 дней.

[705] *Постановка анализа - серийное уничтожение:* криоконсервированные, трансдуцированные первичные Т-клетки, экспрессирующие CAR R12 с указанными спейсерами, размораживали, подсчитывали, ресуспендировали до плотности клеток, равной 2×10^6 CAR+ клеток/мл в среде для анализа клеток, и объем 1 мл или $0,2 \times 10^6$ CAR+ клеток добавляли в 24-луночный планшет, содержащий $0,2 \times 10^6$ клеток Jeko1 в 1 мл среды для анализа клеток, и инкубировали при 37°C в системе для анализа живых клеток IncuCyte (Sartorius). Каждую лунку визуализировали каждые 4 часа для количественного определения количества клеток Jeko1 для оценки кинетики цитотоксичности Т-клеток. Через 68 часов и 148 часов 0,5 мл переносили из предыдущего планшета для совместного культивирования в новый 24-луночный планшет, содержащий $0,2 \times 10^6$ свежих клеток Jeko1 в 1,5 мл среды для анализа клеток. Количество оставшихся клеток Jeko1 в течение 3 раундов совместного культивирования с R12-CART-клетками отслеживали и нормализовали к первой временной точке каждого раунда (т.е. 0 ч, 68 ч и 148 ч).

[706] **Результаты.** Результаты демонстрируют различные уровни независимой от мишени секреции IFN- γ Т-клетками, экспрессирующими различные спейсеры как

компоненты конструкции CAR (**Фиг. 10**). Спейсеры 20 и 23, в частности, индуцировали R12-CART-клетки к явному аутоактивирующему поведению, что привело к повышению уровня обнаружения IFN- γ . Эталонный спейсер «короткий» также приводил к секреции повышенных уровней IFN- γ в отсутствие целевого антигена, человеческого ROR1. Остальные указанные спейсеры проявляли низкие уровни независимой от мишени активации в R12-CART-клетках.

[707] Результаты также указывают на

[708] варьирующие уровни зависимой от мишени секреции IFN- γ и IL-2 Т-клетками, экспрессирующими различные спейсеры в качестве компонента конструкции CAR (**Фиг. 11А**). Спейсер 1, в частности, вызывал секрецию R12-CART-клетками самого высокого уровня IL-2, а спейсер 14, в частности, вызвал секрецию ими самого высокого уровня IFN- γ . В контексте длины спейсеров, выработка IFN- γ и IL-2 Т-клетками была максимальной, когда длина спейсеров CAR составляла от 43,2 Å до 75,6 Å (**Фиг. 11В**). Полный диапазон длин спейсеров, протестированных с использованием CAR R12, составил 43,2 Å ~ 248,4 Å.

[709] R12-CART с эталонным спейсером, «коротким», который также приводил к секреции высоких уровней IFN- γ и IL-2 после воздействия клеток H1975, содержит спейсер длиной 43,2 Å. Выработка цитокинов R12-CART-клетками коррелировала с их целевыми литическими способностями, что измерялось соответствующими значениями AUC (**Фиг. 11С**).

[710] Профиль секреции цитокинов коррелировал с пролонгированными цитотоксическими функциями R12-CART-клеток, поскольку пять спейсеров (спейсеры 1, 11, 13, 14 и короткие) длиной от 43,2 Å до 75,6 Å были способны поддерживать мощную литическую активность в отношении мишени в течение 3 раундов воздействия на мишень (**Фиг. 12А, 12В, 12С, 12D и 12Е**). Полный диапазон длин спейсеров, протестированных с использованием R12-CAR, составил 43,2 Å ~ 248,4 Å. R12-CART с эталонным спейсером, «коротким», который также демонстрировал устойчивую цитотоксическую активность в отношении клеток Jeko1, содержал спейсер длиной 43,2 Å.

Таблица 21: Полные последовательности CAR к ROR1. Спейсер, используемый в каждом CAR к ROR1, указан в первом столбце. Нумерация спейсеров соответствует нумерации с **Фиг. 9**.

Спейсер	Полный CAR с SEQ ID NO без необязательного линкера	Полный CAR с SEQ ID NO с необязательным линкером
1	5072	5049
11	5073	5065
13	5074	5066
14	5075	5067

Таблица 21А: Компоненты последовательности CAR R12 со спейсером 1

CAR R12 со спейсером 1 CAR против ROR1

SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4875	scFv/248 АК
4830	Спейсер 1
4868	Трансмембранный домен/28 АК
4869	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4870	CD3z/112 АК
4871	P2A/21 АК
4872	EGFRt/357 АК (включает сигнальный пептид длиной 22 АК, указанный в SEQ ID NO:4865)

CAR R12, содержащий спейсер 1, нацеленный на ROR1 (с необязательным линкером)

SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4875	scFv/245 АК
4818	Необязательный линкер GGGSG
4830	Спейсер 1
4868	Трансмембранный домен/28 АК
4869	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4870	CD3z/112 АК
4871	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК

Таблица 21В: Компоненты последовательности CAR R12 со спейсером 2

CAR R12, содержащий спейсер 2, нацеленный на ROR1	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4875	scFv/248 АК
4831	Спейсер 2
4868	Трансмембранный домен/28 АК
4869	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4870	CD3z/112 АК
4871	P2A/21 АК

4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК
CAR R12, содержащий спейсер 2, нацеленный на ROR1 (с необязательным линкером)	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4875	scFv/248 АК
4818	Необязательный линкер GGGSG
4831	Спейсер 2
4868	Трансмембранный домен/28 АК
4869	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4870	CD3z/112 АК
4871	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК

Таблица 21С: Компоненты последовательностей CAR R12 со спейсером 3

CAR R12, содержащий спейсер 3, нацеленный на ROR1	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4875	scFv /248 АК
4832	Спейсер 3
4868	Трансмембранный домен/28 АК
4869	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4870	CD3z/112 АК
4871	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК
CAR R12, содержащий спейсер 3, нацеленный на ROR1 (с необязательным линкером)	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4875	scFv /248 АК
4818	Необязательный линкер GGGSG

4832	Спейсер 3
4868	Трансмембранный домен/28 АК
4869	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4870	CD3z/112 АК
4871	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК

Пример 2

Спейсер-зависимая активность Т-клеток с CAR к CD19

[711] В этом исследовании описывается влияние различных спейсеров, полученных из Ig, на индукцию аутоактивации CAR-T, а также на высвобождение и активность цитокинов, направленных на CD19 человека. Эталонная последовательность CAR, используемая для тестирования различных длин спейсеров и составляющих их элементов, показана в Таблице 22 ниже. В настоящем примере использовали те же экспериментальные способы, что и в Примере 1.

Таблица 22: Эталонные последовательности CAR FMC63

CAR FMC63, содержащий короткий эталонный спейсер, нацеленный на CD19	
SEQ ID NO:5076	
SEQ ID NO	Описание
5076	Полная последовательность/837АК
4874	Сигнальный пептид/20АК/АК 1-20
4866	scFv/245АК/АК 21-268
4876	Спейсер/12АК/АК 266-277
4877	Трансмембранный домен/28АК/АК 278-305
4878	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК/АК 306-347
4879	CD3z/112АК/АК 348-459
4880	P2A/21АК/АК 460-480
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335АК/АК 503-837
Компоненты CAR FMC63, содержащие короткий эталонный спейсер, нацеленный на CD19 (с необязательным линкером)	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20АК/АК 1-20
4866	scFv/245АК/АК 21-265

5088	Необязательный линкер GGGGSG
4876	Спейсер/12 АК
4877	Трансмембранный домен/28 АК
4878	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4879	CD3z/112 АК
4880	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
4881	EGFRt/335 АК

[712] CD19-специфические CAR FMC63 доставляли с использованием лентивирусных конструкций, кодирующих бицистронные каскады экспрессии. Кодированные последовательности для (i) CD19-специфического CAR FMC63 (ii) саморасщепляющегося пептида P2A и (iii) EGFRt (усеченный EGFR, имеющий только домены III и IV и трансмембранный домен; SEQ ID NO:4877) были соединены в рамке считывания и помещены под контроль промотора MND. CAR FMC63 были получены из антител к CD19 FMC63 и содержали один из указанных спейсеров, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета. Примеры конструкций CAR, например, со спейсером 1, спейсером 2 и спейсером 3, показаны ниже.

Таблица 23: Полные последовательности CAR к CD19. Спейсер, используемый в каждом CAR к CD19, указан в первом столбце. Нумерация спейсеров соответствует нумерации с Фиг. 9.

Спейсер	Полный CAR с SEQ ID NO без обязательного линкера	Полный CAR с SEQ ID NO с обязательным линкером
7	SEQ ID NO: 5077 без обязательного линкера GGGGSG SEQ ID NO: 5088 перед спейсером 7	5077
8	SEQ ID NO: 5078 без обязательного линкера GGGGSG SEQ ID NO: 5088 перед спейсером 8	5078
9	SEQ ID NO: 5079 без обязательного линкера GGGGSG SEQ ID NO: 5088 перед спейсером 9	5079
10	SEQ ID NO: 5080 без обязательного линкера GGGGSG SEQ ID NO: 5088 перед	5080

	спейсером 10	
11	SEQ ID NO: 5081 без обязательного линкера GGGGSG SEQ ID NO: 5088 перед спейсером 11	5081
14	SEQ ID NO: 5082 без обязательного линкера GGGGSG SEQ ID NO: 5088 перед спейсером 14	5082
16	SEQ ID NO: 5083 без обязательного линкера GGGGSG SEQ ID NO: 5088 перед спейсером 16	5083
28	SEQ ID NO: 5084 без обязательного линкера GGGGSG SEQ ID NO: 5088 перед спейсером 24	5084

Таблица 23А: Компоненты последовательностей CAR FMC63 со спейсером 1

CAR FMC63, содержащий спейсер 1, нацеленный на CD19	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4866	scFv/245 АК
4830	Спейсер 1
4877	Трансмембранный домен/28 АК
4878	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4879	CD3z/112 АК
4880	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК
CAR FMC63, содержащий спейсер 1 CAR, нацеленный на CD19, с необязательным линкером	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4866	scFv/245 АК
5088	Необязательный линкер GGGGSG
4830	Спейсер 1
4877	Трансмембранный домен/28 АК
4878	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК

4879	CD3z/112 АК
4880	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК

Таблица 23В: Компоненты последовательностей CAR FMC63 со спейсером 2

CAR FMC63, содержащий спейсер 2, нацеленный на CD19	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4866	scFv/245 АК
4831	Спейсер 2
4877	Трансмембранный домен/28 АК
4878	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4879	CD3z/112 АК
4880	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК
CAR FMC63, содержащий спейсер 2, нацеленный на CD19, с необязательным линкером	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4866	scFv/245 АК
5088	Необязательный линкер GGGGSG
4831	Спейсер 2
4877	Трансмембранный домен/28 АК
4878	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4879	CD3z/112 АК
4880	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК

Таблица 23С: Компоненты последовательностей CAR FMC63 со спейсером 3

CAR FMC63, содержащий спейсер 3, нацеленный на CD19	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4866	scFv/245 АК

4832	Спейсер 3
4877	Трансмембранный домен/28 АК
4878	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4879	CD3z/112 АК
4880	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК
CAR FMC63, содержащий спейсер 3, нацеленный на CD19, с необязательным линкером	
SEQ ID NO	Описание
4874	Сигнальный пептид/20 АК
4866	scFv/245 АК
5088	Необязательный линкер GGGGSG
4832	Спейсер 3
4877	Трансмембранный домен/28 АК
4878	Костимулирующий домен 4-1BB/42 АК
4879	CD3z/112 АК
4880	P2A/21 АК
4865	Сигнальный пептид/22 АК
5064	EGFRt/335 АК

[713] Поверхностную экспрессию scFv CAR FMC63 детектировали с использованием анти-ID-AF647 (Lyell), разбавленного 1:2000 в буфере для окрашивания клеток. Эффективность трансдукции определяли путем окрашивания поверхности на маркер трансдукции EGFRt с использованием анти-hEGFR-BV421 (BioLegend, кат. № 352911), разбавленного 1:40 в буфере для окрашивания клеток. Клетки осаждали после 20-минутной инкубации в темноте с последующей двукратной промывкой буфером для окрашивания клеток. Весь анализ методом проточной цитометрии выполняли на анализаторе клеток ZE5 (BioRad) и анализировали с помощью FlowJo (Tree Star).

[714] Т-клетки здоровых доноров трансдуцировали лентивирусами, кодирующими CAR FMC63, содержащими спейсеры, полученные из Ig, до уровня трансдукции от 40% до 80% на основе окрашивания EGFRt (**Фиг. 13А, Фиг. 13С**), а уровни экспрессии их CAR оценивали путем окрашивания антителом к FMC63, конъюгированным с AlexaFluor647 (**Фиг. 13В, Фиг. 13D**). CART-клетки стимулировали Raji-NLR (**Фиг. 13А-D, 14А-Е**), Nalm6-NLR (**Фиг. 15А-Е, 16А-Е**) и Raji_CD19_KO-NLR (**Фиг. 18А-Е, 19А-Е**) для определения кинетики уничтожения и зависимой от мишени продукции цитокинов. CART-клетки также культивировали в отсутствие клеток-мишеней для оценки

независимой от мишенной продукции цитокинов, что является показателем аутоактивации. Независимая от мишени секреция цитокинов обычно была низкой (**Фиг. 20А-С, 21А-С**). Количество продуцируемых цитокинов через 24 часа после совместного культивирования коррелировало с более быстрой кинетикой уничтожения, причем особенно хорошо себя показали спейсеры 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16 и 28 (**Фиг. 22А-В**). Продукция IFN- γ и IL-2 была самой высокой, когда длина спейсера CAR составляла от 50 Å до 110 Å (**Фиг. 23А-Д**). Точно так же краткосрочная цитотоксичность была эффективной, когда длина спейсера составляла от 50 Å до 110 Å (**Фиг. 24А-В**). Мы наблюдали, что FMC63-CART-клетки, содержащие спейсеры 7, 8, 9, 10, 14, 16 и 28, были способны поддерживать мощную литическую активность мишени в течение нескольких раундов воздействия на мишень (**Фиг. 25А-Д, 26А-Д**).

Пример 3

Спейсер-зависимая активность Т-клеток с CAR к Her2

[715] В этом исследовании описывается влияние различных спейсеров, полученных из Ig, на индукцию аутоактивации CAR-T, а также на высвобождение и активность цитокинов, направленных на Her2. В настоящем примере использовали те же экспериментальные способы, что и в Примере 1.

[716] CAR, полученные к Her2, доставляли с использованием лентивирусных конструкций, кодирующих бицистронные кассеты экспрессии. Кодирующие последовательности для (i) CAR, полученные к Her2, (ii) саморасщепляющегося пептида P2A и (iii) EGFRt (усеченный EGFR, имеющий только домены III и IV и трансмембранный домен) были связаны в рамке и помещены под контролем промотора MND. CAR к Her2 включали scFv, полученные из антитела к Her2 трастузумаба, и содержали один из указанных спейсеров, полученный из CD28 трансмембранный домен, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета.

[717] Поверхностную экспрессию scFv CAR к Her2 определяли с использованием белка L-биотина (Thermo Scientific, кат. № 29997), разбавленного 1:6000 в буфере для окрашивания клеток, а затем стрептавидин-BV421 (BioLegend, кат. № 405226), разбавленного 1:400 в буфере для окрашивания клеток. Эффективность трансдукции определяли путем окрашивания поверхности на маркер трансдукции EGFRt с использованием анти-hEGFR-PE (BioLegend, кат. № 252903), разбавленного 1:40 в буфере для окрашивания клеток.

[718] Т-клетки здоровых доноров трансдуцировали лентивирусами, кодирующими CAR к Her2, содержащими спейсеры, полученные из Ig, до уровня трансдукции от 20% до 70% на основе окрашивания EGFRt (**Фиг. 27А, Фиг. 27С**), а уровни экспрессии их CAR оценивали путем окрашивания белком L-биотином, а затем стрептавидином-BV421 (**Фиг. 27В, Фиг. 27Д**). CART-клетки стимулировали A549-NLR (**Фиг. 28А-Е, 29А-Е**), T47D-NLR (**Фиг. 30А-Е, 31А-Е**), и T47D-Her2KO-NLR (**Фиг. 32А-Е, 33А-Е**) для определения кинетики уничтожения и зависимой от мишени продукции цитокинов. CAR-T-клетки также культивировали в отсутствие клеток-мишеней для оценки независимой от мишеней

продукции цитокинов, что является показателем аутоактивации. Независимая от мишени секреция цитокинов обычно была низкой (Фиг. 34А-С, 35А-С). Количество продуцируемых цитокинов через 24 часа после совместного культивирования коррелировало с более быстрой кинетикой уничтожения, причем особенно хорошо себя показали спейсеры 6, 7, 8, 11, 16 и промежуточное соединение (Фиг. 36А-Д). Продукция IFN- γ и IL-2 была самой высокой, когда длина спейсера CAR составляла от $\sim 57 \text{ \AA}$ до $\sim 122 \text{ \AA}$ (Фиг. 37А-Д). Точно так же краткосрочная цитотоксичность была эффективной, когда длина спейсера составляла от $\sim 57 \text{ \AA}$ до $\sim 122 \text{ \AA}$ (Фиг. 38А-Д). Мы наблюдали, что Т-клетки с CAR, полученными к Her2, содержащие спейсеры 6, 7, 8, 16 и промежуточные соединения, были лучше всего способны поддерживать целевую литическую активность в течение повторных раундов воздействия на мишень (Фиг. 39А-Д, Фиг. 40А-Д).

Таблица 24: Полные последовательности CAR к Her2. Спейсер, используемый в каждом CAR к Her2, указан в первом столбце. Нумерация спейсеров соответствует нумерации с Фиг. 9. Линкер scFv SEQ ID NO: 5003 может быть необязательно заменен на SEQ ID NO: 5004.

Спейсер	Полный CAR с SEQ ID NO без необязательного линкера	Полный CAR с SEQ ID NO с необязательным линкером
6	5005	5035
7	5006	5036
8	5007	5037
16	5008	5038

Таблица 25: Спейсеры, использованные в Примере 4, соответствующие Фиг. 44А-77Е.

Идентификатор спейсера	Линкер SEQ ID NO	Спейсер SEQ ID NO	Длина (включая линкер), \AA	Спейсер Идентификатор	Линкер SEQ ID NO	Спейсер SEQ ID NO	Длина (включая линкер), \AA
1	4818	4830	50,4	25	4818	1768	86,4
2	4818	4831	57,6	26	4818	1889	79,2
3	4818	4832	72	27	4818	2015	68,4
4	4818	4833	248,4	28	4818	4856	54
5	4818	4834	205,2	29	4818	4857	111,6
6	4818	4835	187,2	30	4818	4858	54
7	4818	4836	133,2	31	4818	4859	61,2
8	4818	4837	97,2	41ВВ_1	4818	5009	197,6
9	4818	4838	79,2	41ВВ_2	4818	5010	138,3

10	4818	4839	79,2	41BB_3	4818	5011	106,7
11	4818	4840	75,6	CD8a	4818	5012	194,4
13	4818	4841	46,8	CD27_1	4818	5013	324,4
14	4818	4842	57,6	CD27_2	4818	5014	270
15	4818	4843	43,2	CD28	4818	5015	158,4
16	4818	4844	118,8	Short_nodisulf	4818	5016	61,2
17	4818	4845	54	Dap10	4818	5017	65,8
18	4818	4846	54	GS_short_nodisulf	4818	5018	61,2
19	4818	4847	50,4	ICOS	4818	5019	111,6
20	4818	4848	72	OX40	4818	5020	190,8
21	4818	4849	43,2	Промежуточное соединение	4818	4912	104,5
22	4818	4850	43,2	Длинный (CH2CH3)	4818	4913	138,9
23	4818	4851	64,8	Короткий (шарнир IgG4)	4818	4911	43,2
24	4818	4852	295,2				

* В некоторых аспектах необязательный линкер SEQ ID NO: 4818 может быть заменен линкером SEQ ID NO: 5088

Пример 4

Спейсер-зависимая активность Т-клеток с CAR к ROR1

[719] **CAR R11:** В этом исследовании описывается влияние различных спейсеров, полученных из Ig или внеклеточных доменов, на индукцию аутоактивации CAR-T, а также на высвобождение и активность цитокинов, направленных на ROR1 человека. ROR1-специфические CAR R11 доставляли с использованием лентивирусных конструкций, кодирующих бицистронные кассеты экспрессии. Кодирующие последовательности для (i) ROR1-специфического CAR R11, (ii) саморасщепляющегося пептида P2A и (iii) EGFRt (усеченный EGFR, имеющий только домены III и IV и трансмембранный домен; SEQ ID NO:26) были соединены в рамке считывания и помещены под контроль промотора MND. CAR R11 были получены из антитела к ROR1 R11, и каждый из них содержит один из указанных спейсеров, полученный из CD28 трансмембранный домен, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-

дзета.

[720] Результаты указывают на различные уровни зависимой от мишени секреции IFN- γ и IL-2 CAR-T-клетками, экспрессирующими CAR R11, имеющие разные спейсеры в качестве компонента конструкции CAR. Спейсеры 4 (ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAP; SEQ ID NO: 4833, или GGGGSGELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAP; SEQ ID NO: 5039 при включении линкера SEQ ID NO:5088), 5 (CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAP; SEQ ID NO: 4834; или GGGGSGCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAP; SEQ ID NO: 5040 при включении линкера SEQ ID NO:5088) и 6 (EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAP; SEQ ID NO: 4835; или GGGGSGEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAP; SEQ ID NO: 5041 при включении линкера SEQ ID NO:5088) в частности, у R11-CAR-T-клеток индуцировали секрецию самого высокого уровня цитокинов и индуцировали самый высокий уровень уничтожения (самая низкая AUC на кинетических кривых уничтожения IncuCyte) у обоих доноров. Никакого тонического сигналинга не наблюдали ни в одной из CAR-T-клеток. Что касается длины спейсера, то выработка IFN- γ и IL-2 T-клетками была максимальной, когда длина спейсера CAR находилась в диапазоне 187-248 Å. См. Фиг. 44A-44D, 45A-45C, 46A-46C, 47A-47C, 48A-48B, 49A-49B, 50A-50B, 51, 52, 53A-53B и 54A-54B.

[721] **CAR R12:** В этом исследовании описывается влияние различных спейсеров, полученных из Ig или внеклеточных доменов, на индукцию аутоактивации CAR-T, а также на высвобождение и активность цитокинов, направленных на ROR1 человека. ROR1-специфические CAR R12 доставляли с использованием лентивирусных конструкций, кодирующих бицистронные кассеты экспрессии. Кодирующие последовательности для (i) ROR1-специфического CAR R12, (ii) саморасщепляющегося пептида P2A и (iii) EGFRt (усеченный EGFR, имеющий только домены III и IV и трансмембранный домен; SEQ ID NO:26) были соединены в рамке считывания и помещены под контроль промотора MND. CAR R12 были получены из антитела к ROR1 R12, и каждый из них содержит один из указанных спейсеров, полученный из CD28 трансмембранный домен, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета.

[722] Результаты указывают на различные уровни зависимой от мишени секреции IFN- γ и IL-2 CAR-T-клетками, экспрессирующими CAR R12, имеющие разные спейсеры в качестве компонента конструкции CAR. Спейсер 1 (KPCPPCKCP; SEQ ID NO: 4830; или GGGSGKPCPPCKCP; SEQ ID NO: 5042 при включении линкера SEQ ID NO:4818), 15 (PPKPKDT; SEQ ID NO: 4843; или GGGSGPPKPKDT; SEQ ID NO: 5043 при включении линкера SEQ ID NO:4818) и 21 (VPCPVPP; SEQ ID NO: 4849; или GGGSGVPCPVPP; SEQ

ID NO: 5044 при включении линкера SEQ ID NO:4818) в частности, у R12-CAR-T-клетки индуцировали секрецию самого высокого уровня цитокинов и индуцировали самый высокий уровень уничтожения (самая низкая AUC на кинетических кривых уничтожения IncuCyte) у обоих доноров). Никакого тонического сигналинга не наблюдали ни в одной из CAR-T-клеток. Что касается длины спейсера, то выработка IFN- γ и IL-2 T-клетками была самой высокой, когда длина спейсера CAR составляла примерно 45 Å. См. **Фиг. 55A-55D, 56A-56C, 57A-57C, 58A-58C, 59A-59B, 60A-60B, 61A-61B, 62, 63, 64A-64B и 65A-65B.**

[723] **CAR 2A2:** В этом исследовании описывается влияние различных спейсеров, полученных из Ig или внеклеточных доменов, на индукцию аутоактивации CAR-T, а также на высвобождение и активность цитокинов, направленных на ROR1 человека. ROR1-специфические CAR 2A2 доставляли с использованием лентивирусных конструкций, кодирующих бицистронные кассеты экспрессии. Кодирующие последовательности для (i) ROR1-специфического CAR 2A2, (ii) саморасщепляющегося пептида P2A и (iii) EGFRt (усеченный EGFR, имеющий только домены III и IV и трансмембранный домен; SEQ ID NO:26) были соединены в рамке считывания и помещены под контроль промотора MND. CAR 2A2 были получены из антитела к ROR1 2A2, и каждый из них содержит один из указанных спейсеров, полученный из CD28 трансмембранный домен, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета.

[724] Результаты показали различные уровни зависимой от мишени секреции IFN- γ и IL-2 CAR-T-клетками, экспрессирующими различные спейсеры в качестве компонента конструкции CAR. Спейсер 13 (PCPRCPAP; SEQ ID NO: 4841; или GGGGSGPCPRCPAP; SEQ ID NO: 5045 при включении линкера SEQ ID NO:5088), 21 (VPCPVPP; SEQ ID NO: 4849; или GGGGSGVPCPVPP; SEQ ID NO: 5044 при включении линкера SEQ ID NO:5088) и 28 (SVCSRDFTPP; SEQ ID NO: 4856; или GGGGSGSVCSRDFTPP; SEQ ID NO: 5046 при включении линкера SEQ ID NO:5088) в частности, у 2A2-CAR-T-клетки индуцировали секрецию самого высокого уровня цитокинов и индуцировали самый высокий уровень уничтожения (самая низкая AUC на кинетических кривых уничтожения IncuCyte) для обоих доноров. Ни в одной из CAR-T-клеток не наблюдали тонического сигналинга, как показано на Фиг. 30 и Фиг. 31. Что касается длины спейсера, то выработка IFN- γ и IL-2 T-клетками был самым высоким, когда длина спейсера CAR составляла приблизительно 45 Å. См. **Фиг. 66A-66D, 67A-67C, 68A-68C, 69A-69C, 70A-70B, 71A-71B, 72A-72B, 73, 74, 75A-75B, и 76A-76B.**

Таблица 26: Идентифицированные последовательности наиболее активных CAR

	ROR1		
	R11	R12	2A2
Описание	SEQ ID NO	SEQ ID NO	SEQ ID NO
Сигнальный пептид	4874	4874	4874

scFv	5048	4875	5047
линкер Gly/Ser	4818	5088	4818
Спейсер	4833 (Спейсер 4) 4834 (Спейсер 5) 4835 (Спейсер 6)	4830 (Спейсер 1) 4843 (Спейсер 15) 4849 (Спейсер 21)	4841 (Спейсер 13) 4849 (Спейсер 21) 4856 (Спейсер 28)
Трансмембранный домен	4868	4868	4868
Костимулирующий домен 4-1BB	4869	4869	4869
CD3z	4870	4870	4870
P2A	4871	4871	4871
EGFRt, включая сигнальный пептид GMCSF SEQ ID NO: 4865	4872	4872	4872

Краткое изложение Примеров 1-4

[725] Результаты показали, что оптимальный спейсер отличается в зависимости от связывающего компонента. Как правило, для CAR, направленных против проксимальных к мембране эпитопов, предпочтительны длинные спейсеры, а для CAR, нацеленных против дистальных к мембране эпитопов, предпочтительны короткие спейсеры. Оптимальные длины спейсеров для CAR R12, 2A2, FMC63, Her и R11 показаны на **Фиг. 77А-77Е**, соответственно. Полные последовательности CAR с оптимальными спейсерами CAR, идентифицированными в соответствии с описанными в данном документе способами, представлены в **Таблице 27** ниже. Результаты показали, что раскрытая коллекция спейсеров имеет надлежащие биофизические свойства (например, форму, гибкость/жесткость) для создания высокоактивных CAR, и вся коллекция полезна для эмпирического определения оптимального спейсера для данной пары CAR/целевой антиген, либо при использовании раскрытых спейсеров в качестве скрининговой библиотеки, либо для рационального конструирования на основе размеров спейсеров, групп связывания и положения антигена относительно сигнального синапса (см. **Фиг. 77А-77Е**).

Таблица 27: Полные последовательности CAR для CAR, нацеленных на ROR1 (CAR, содержащие связывающие компоненты R11, R12 и 2A2), CD19 (CAR, содержащие связывающий компонент FMC63) и Her2 (CAR, содержащие связывающий компонент 4D5).

связывающие компоненты выделены жирным шрифтом, линкеры выделены курсивом, спейсеры подчеркнуты Составные элементы CAR могут

независимо отсутствовать или быть заменены гомологичным элементом, описанным в данном документе, известным в данной области техники, или его вариантом или производным. Например, описанный в данном документе трансмембранный домен может быть заменен функционально эквивалентным трансмембранным доменом. Аналогично, один или более из костимулирующих доменов 4-1BB, доменов CD3z, доменов P2A или доменов EGFRt могут быть заменены функционально эквивалентными доменами.

CAR R12 против ROR1

Спейсер	Полный CAR с SEQ ID NO	Последовательность
1	5049	MVLQTQVFISLLLWISGAYGQEQLVESGGRLVTPGGSLT LSCKASGFDFSA YYMSWVRQAPGKGLEWIA TIYPSSGK TYyatwvNGRFTISSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYF CARDSYADDGALFNIWGPGLVTISSGGGGSGGGGSGG GGSELVLTQSPSVSAALGSPAKITCTLSSAHKTD TIDWY QQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSSSGAD RYLIIPSVQADDEADYCYGADYIGGYVFGGGTQLTVTG GGGSGKPCPPCKCPMFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRS GATNFSLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIP RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTISGDLHILPVAF RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKAT GQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLL EGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATGMV GALLLLLVVAL GIGLFM
15	5050	MVLQTQVFISLLLWISGAYGQEQLVESGGRLVTPGGSLT

		<p> LSCKASGFDFSA YYMSWVRQAPGKGLEWIA TIYPSSGK TYYATWVNGRFTISSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYF CARDSYADDGALFNIWGPGLVTISSGGGGSGGGGSGG GGSELVLTQSPSVSAAALGSPAKITCTLSSAHKTDIDWY QQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSSSGAD RYLIIPSVQADDEADYYCGADYIGGYVFGGGTQLTVTG GGGSGPPKPKDTMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGAT NFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKV CNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSSISGDLHILPVAFRGD SFHTPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATGQ VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC TYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIG LFM </p>
21	5051	<p> MVLQTQVFISLLLWISGAYGQEQLVESGGRLVTPGGSLT LSCKASGFDFSA YYMSWVRQAPGKGLEWIA TIYPSSGK TYYATWVNGRFTISSDNAQNTVDLQMNSLTAADRATYF CARDSYADDGALFNIWGPGLVTISSGGGGSGGGGSGG GGSELVLTQSPSVSAAALGSPAKITCTLSSAHKTDIDWY QQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSSSGAD RYLIIPSVQADDEADYYCGADYIGGYVFGGGTQLTVTG GGGSGVPCPVPPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGAT NFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKV CNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSSISGDLHILPVAFRGD </p>

		SFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIS GNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC TYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIG LFM
CAR FMC63 против CD19		
Спейсер	Полный CAR с SEQ ID NO	Последовательность
9	5052	MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLV APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGEP <u>KSCDTPPPCPRCPAPMFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIF</u> WVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRS GATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIP RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAF RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKAT GQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLL EGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVAL GIGLFM
10	5053	MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQTSSLSASLGDRVT

		<p> ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLV APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGI WGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGEP <u>KSCDKTHTCPPCPAPMFWVLVVGGLACYSLLVTVAFIIF</u> WVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRS GATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIP RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSIGDLHILPVAF RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKAT GQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLL EGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCPNGPKPSIATGMV GALLLLLVVAL GIGLFM </p>
11	5054	<p> MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLV APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGI WGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGPK <u>SCDKTHTCPPCPAPMFWVLVVGGLACYSLLVTVAFIIF</u> WVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRS GATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIP RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSIGDLHILPVAF </p>

		<p>RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKAT GQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLL EGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVAL GIGLFM</p>
CAR 4D5 против Her2		
Спейсер	Полный CAR с SEQ ID NO	Последовательность
7	5055	<p>MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG QGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSGEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSEPKSCDT PPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPMFVVLVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPRSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCEL PHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISG DLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAW PENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLR SLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISN RGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGR ECVDKCNLLEGEPRREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGR GPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADA GHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GAL LLLVVALGIGLFM</p>
8	5056	MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI

		<p>TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYYTPPTFG QGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSGEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS<u>CPRCPEP</u> <u>KSCDTPPPCPRCPAPMFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIF</u> WVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRS GATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIP RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAF RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKAT GQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLL EGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCPNGPKPSIATGMV GALLLLLVVAL GIGLFM</p>
16	5057	<p>MVLQQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYYTPPTFG QGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSGEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS<u>TVPCPVP</u> <u>STPPTPSPSTPPTPSPSCCHPMFWVLVVVGGVLACYLLVT</u> VAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPRS GATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHP AFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHI</p>

		<p>LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPEN RTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEI SDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENS CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECV KCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDN CIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVC HLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLL VVALGIGLFM</p>
CAR 2A2 против ROR1		
Спейсер	Полный CAR с SEQ ID NO	Последовательность
13	5058	<p>MVLQTQVFISLLLWISGAYGQVQLQQSGAELVRPGASVT LSCKASGYTFSDYEMHWVIQTPVHGLEWIG AIDPETGG TAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC TGYDYDSFTYWGGTGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGS DIVMTQSQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAVAWYQQ KPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISN MQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGTKLEIKTGGGGSGPC <u>PRCPAP</u>MFVVLLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGATNFSLLK QAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGI GEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRG RTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLC YANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCS PEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVE NSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCV KTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTG PGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLL VVALGIGLFM</p>
21	5059	<p>MVLQTQVFISLLLWISGAYGQVQLQQSGAELVRPGASVT LSCKASGYTFSDYEMHWVIQTPVHGLEWIG AIDPETGG</p>

		<p>TAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC TGYYDYDSFTYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGS DIVMTQSQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAVAWYQQ KPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISN MQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGTKLEIKTGGGGSGV <u>PCPVPPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKK</u> LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGATNFSLLK QAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGI GEFKDLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRG RTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLC YANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCS PEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVE NSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCV KTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGTG PGLEGPTNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM</p>
<p>28</p>	<p>5960</p>	<p>MVLQTQVFISLLLWISGAYGQVQLQQSGAELVRPGASVT LSCKASGYTFSDYEMHWVIQTPVHGLEWIGAIIDPETGG TAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC TGYYDYDSFTYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGS DIVMTQSQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAVAWYQQ KPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISN MQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGTKLEIKTGGGGSGS <u>VCSRDFTPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRG</u> RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGATNFS LLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCN GIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSF THTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENL EIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGN</p>

		KNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATGQVC HALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGE REFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYID GPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCT YGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGL FM
CAR R11 против ROR1		
Спейсер	Полный CAR с SEQ ID NO	Последовательность
4	5061	MVLQTQVFISLLLWISGAYGQSVKESEGDLVTPAGNLT CTASGSDINDYPISWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTWYA SWVKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYST YYGDFNIWGPGLVTISSGGGGSGGGGGGGSELVMT QTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAWFQQKPGQPP LLIYRASNLASGVPSRFSRSGTEYTLTISGVQREDA TYYCLGGVGNVSYRTSFGGGTEVVVKTGGGGSGELKTP <u>LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE</u> <u>PKSCDTPPPCPRCPAPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII</u> FWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRS GATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFL LIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSSISGDLHILP VAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPEN RDTLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSL KEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRE CVDKCNLLEGEPRREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGR GPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADA GHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVG ALLLLVVALGIGLFM
5	5062	MVLQTQVFISLLLWISGAYGQSVKESEGDLVTPAGNLT CTASGSDINDYPISWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTWYA

		<p>SWVKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYST YYGDFNIWGPGLVTISSGGGGSGGGGSGGGGSELVMT QTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAWFQQKPGQPP TLLIYRASNLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISGVQREDA TYYCLGGVGNVSYRTSFGGGTEVVVKTGGGGSGCPRCP <u>EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPR</u> <u>CPAPMFVVLVVVGGVLCYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLL</u> YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGATNFSLLKQA GDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRVCNIGIGI GEFKDSLSINATNIKHFNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT KQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVIISGNKNC LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCS PEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENS ECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKT CPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPG LEGCPTNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM</p>
<p>6</p>	<p>5063</p>	<p>MVLQTQVFISLLLWISGAYGQSVKESEGDLVTPAGNLTLT CTASGSDINDYPISWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTWYA SWVKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYST YYGDFNIWGPGLVTISSGGGGSGGGGSGGGGSELVMT QTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAWFQQKPGQPP TLLIYRASNLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISGVQREDA TYYCLGGVGNVSYRTSFGGGTEVVVKTGGGGSGEPKSC <u>DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPM</u> <u>FWVLVVVGGVLCYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQ</u> PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGATNFSLLKQA GDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRVCNIGIGI GEFKDSLSINATNIKHFNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP PLDPQELDI</p>

	LKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQF SLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWK KLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPE PRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHP ECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVM GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPN GPKPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM
--	--

Таблица 28: Краткое описание свойств выбранных CAR

Связывающий компонент	Донор	Спейсер	Длина спейсера с линкером (Å)	Нормализованная AUC для Nalm6	Нормализованная AUC для Raji	IFNg Nalm6	IL-2 Nalm6	IFNg Raji
FMC63	3868	9	79,2	14,9	19,1	62067	68	142559
FMC63	3868	10	79,2	14,2	18,3	65929	41	158893
FMC63	3868	11	75,6	13,2	17,9	53252	23	146062
FMC63	4869	9	79,2	14,3	49,5	53816	945	100333
FMC63	4869	10	79,2	15,5	45,4	72105	517	139572
FMC63	4869	11	75,6	12,2	46,2	54543	211	114046
Связывающий компонент	Донор	Спейсер	Длина спейсера (Å)	Нормализованная AUC для A549	Нормализованная AUC для T47D	IFNg A549	IL-2 A549	IFNg T47D
Герцептин *	15842	7	115,2	61,3	44,2	163107	267	162769
Герцептин *	15842	8	79,2	66,1	46,1	120256	128	167636
Герцептин *	15842	16	100,8	62,0	50,3	125690	157	163484
Герцептин *	13814	7	115,2	61,9	43,5	104083	138	130715
Герцептин *	13814	8	79,2	64,5	41,3	94188	194	154415
Герцептин	1381	16	100,8	60,6	35,8	95916	178	166721

*	4							
Связывающий компонент	Донор	Спейсер	Длина спейсера с линкером (Å)	Нормализованная AUC для A549	Нормализованная AUC для H1975	IFNg A549	IL-2 A549	IFNg H1975
R12	2735	1	50,4	67,6	67,6	8935	4	15716
R12	2735	15	43,2	64,0	63,0	13752	8	16921
R12	2735	21	43,2	66,3	61,5	14082	7	23225
R12	5018	1	50,4	80,9	68,8	4349	0	4846
R12	5018	15	43,2	81,2	75,0	7613	9	4315
R12	5018	21	43,2	85,0	77,4	5001	8	2651
R11	7811	4	248,4	54,6	83,1	46161	26	15901
R11	7811	5	205,2	48,8	69,6	83558	87	32411
R11	7811	6	187,2	51,4	96,5	86709	89	11873
R11	5018	4	248,4	59,1	94,5	37008	5	9128
R11	5018	5	205,2	55,8	86,7	60935	10	17320
R11	5018	6	187,2	58,4	114,2	46294	10	7174
2A2	2089	13	46,8	42,0	37,9	46579	1	67057
2A2	2089	21	43,2	38,0	39,4	55445	1	78043
2A2	2089	28	54	43,6	39,5	49905	1	78267
2A2	5018	13	46,8	61,0	43,2	38935	3	54335
2A2	5018	21	43,2	58,9	43,2	41252	3	61898
2A2	5018	28	54	61,0	44,3	34242	2	58088

* Расчеты длины спейсера Her2 не включают линкер GGGSG с SEQ ID NO: 4818

Связывающий компонент	Донор	Спейсер	Длина спейсера с линкером (Å)	IL-2 Raji	Нормализованная AUC для Raji_CD19_KO	IFNg Raji_CD19_KO	IL-2 Raji_CD19_KO	IFNg без мишени
FMC63	3868	9	79,2	3216	238307	4480	17	1211
FMC63	3868	10	79,2	5497	247388	4745	12	1649
FMC63	3868	11	75,6	3372	245963	3667	9	1853
FMC63	4869	9	79,2	10092	223873	3501	32	556

FMC63	4869	10	79,2	13465	199757	6382	41	2984
FMC63	4869	11	75,6	9042	240626	3048	18	638
Связывающий компонент	Донор	Спейсер	Длина спейсера (Å)	T47D IL-2	Нормализованная AUC для T47D_Her2_KO	IFNg T47D_Her2_KO	IL-2 T47D_Her2_KO	IFNg без мишени
Герцептин *	15842	7	115,2	857	509961	2632	2	1830
Герцептин *	15842	8	79,2	1525	563903	2532	1	1764
Герцептин *	15842	16	100,8	1147	713877	2470	1	1674
Герцептин *	13814	7	115,2	731	827793	1619	1	1331
Герцептин *	13814	8	79,2	1459	823493	1533	1	1415
Герцептин *	13814	16	100,8	984	804135	2581	0	2024
Связывающий компонент	Донор	Спейсер	Длина спейсера с линкером (Å)	H1975 IL-2	Нормализованная AUC для A549_ROR1_KO	IFNg A549_ROR1_KO	IL-2 A549_ROR1_KO	IFNg без мишени
R12	2735	1	50,4	10	283488	995	0	419
R12	2735	15	43,2	17	262223	1353	3	415
R12	2735	21	43,2	26	264326	1391	0	478
R12	5018	1	50,4	0	275978	465	1	1051
R12	5018	15	43,2	10	299606	1528	1	2004
R12	5018	21	43,2	7	301079	1257	1	2157
R11	7811	4	248,4	4	275413	3778	2	2437
R11	7811	5	205,2	16	238046	6430	3	3317
R11	7811	6	187,2	2	256889	5902	2	3292
R11	5018	4	248,4	1	301271	3221	1	2744

R11	5018	5	205,2	2	279139	5458	1	3391
R11	5018	6	187,2	1	297120	5353	1	3814
2A2	2089	13	46,8	1	161899	13199	1	15196
2A2	2089	21	43,2	2	175504	16360	1	19127
2A2	2089	28	54	1	168503	19835	1	22465
2A2	5018	13	46,8	14	225124	4030	0	4824
2A2	5018	21	43,2	13	233789	5220	0	6602
2A2	5018	28	54	8	215509	5721	1	6763

* Расчеты длины спейсера Het2 не включают линкер GGGSG с SEQ ID NO: 4818

Пример 5

Противоопухолевая активность CAR R12 in vivo

[726] **Способы:** Опухолевые клетки NCI-H1975 имплантировали мышам со степенью приживаемости 100%. Животных рандомизировали в группы лечения по 5 животных через 11 дней после имплантации опухоли в зависимости от объема опухоли со средним размером опухоли 101,91 мм³ +/- 1,24 мм³. Все группы внутривенно получали соответствующее лечение Т-клетками на 12-й день. Измерения опухоли проводили штангенциркулем, а массу тела измеряли цифровыми весами 2 раза в неделю. Кровь для фармакокинетического анализа собирали из субментальной области через 24 часа после введения дозы Т-клеток, а затем еженедельно в течение 5 недель. Животных подвергали эвтаназии, когда размер опухоли достигал 2000 мм³, потеря массы тела превышала 20% или она умирала.

[727] **Результаты:** исследование было успешно проведено и продемонстрировало, что R12-1 (CAR, содержащий спейсер 1; SEQ ID NO: 5049) обладает самой высокой противоопухолевой активностью среди всех протестированных продуктов, проявляющейся самыми низкими объемами опухоли, увеличенной выживаемостью и заметным увеличением в количестве периферических CAR⁺ Т-клеток (как для CD4⁺, так и для CD8⁺ Т-клеток) к 14 дню при обоих уровнях доз (см. Фиг. 82А-85L; ФК графики демонстрируют среднее значение +/- стандартная ошибка среднего для всех животных, которые оставались живыми на момент отбора проб). R12-IgG4 (CAR с «коротким» эталонным спейсером SEQ ID NO: 4911) был вторым по силе CAR-Т-клеточным продуктом, также увеличивающим выживаемость, но без экспансии Т-клеток в крови. Одно животное в группе R12-CD8a (CAR со спейсером CD8a) имело отсроченный, но сильный противоопухолевый ответ, который совпал с сильной экспансией CAR Т-клеток в крови на 28-й день. Ни у одного другого животного в этой группе не было противоопухолевого ответа, поэтому группа R12-CD8a считается неэффективной. Продукты R12-5 (CAR, содержащий спейсер 5) и R12-16 (CAR, содержащий спейсер 16) не проявляли значительной противоопухолевой активности ни при каком протестированном уровне дозы. См. Фиг. 78А-Фиг. 85L.

[728] Следует принять во внимание, что раздел «Подробное описание сущности изобретения», а не разделы «Краткое описание сущности изобретения» и «Реферат», предназначен для интерпретации формулы изобретения. В разделах «Сущность изобретения» и «Реферат» указаны один или более, но не все иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения, как это предусмотрено изобретателем(-ями), и, таким образом, не предназначены для ограничения настоящего изобретения и прилагаемой формулы изобретения любым способом.

[729] Настоящее изобретение было описано выше с помощью функциональных структурных блоков, иллюстрирующих осуществление указанных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных структурных элементов были произвольно определены в данном документе для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены до тех пор, пока указанные функции и их отношения будут надлежащим образом выполняться.

[730] Вышеизложенное описание конкретных вариантов осуществления полностью отражает общий характер настоящего изобретения, который другие могут, применяя знания в пределах уровня техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных путей применения таких конкретных вариантов осуществления, без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы быть в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления на основе представленных в данном документе инструкций и указаний. Следует понимать, что формулировки или терминология в данном документе предназначены для описания, а не ограничения, так что терминология или формулировки данного описания должна интерпретироваться квалифицированным специалистом в свете инструкций и указаний.

[731] Объем притязаний и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных иллюстративных вариантов осуществления, но должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и их эквивалентами.

[732] Содержание всех процитированных ссылок (включая литературные ссылки, патенты, заявки на патенты и веб-сайты), которые могут цитироваться в этой заявке, явным образом включены в данное описание посредством ссылки во всей их полноте для любых целей, как и ссылки, цитируемые в ней.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR - англ.: chimeric antigen receptor), содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

где

спейсер имеет длину от около 150 до около 125 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер имеет длину от около 125 до около 100 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер имеет длину от около 100 до около 75 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер имеет длину от около 75 до около 36 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å;

спейсер имеет длину от около 35 аминокислот до около 21 аминокислоты; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å;

спейсер имеет длину от около 20 до около 16 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å;

спейсер имеет длину от около 15 до около 11 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å; или

спейсер имеет длину от около 10 до около 5 аминокислот; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å.

2. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

где

спейсер имеет длину от около 450 Å до около 375 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер имеет длину от около 375 Å до около 300 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер имеет длину от около 300 Å до около 225 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å;

спейсер имеет длину от около 225 Å до около 100 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å;

спейсер имеет длину от около 100 Å до около 60 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å;

спейсер имеет длину от около 60 Å до около 45 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å;

спейсер имеет длину от около 45 Å до около 30 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å; или

спейсер имеет длину от около 30 Å до около 15 Å; и расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å.

3. Полинуклеотид по п. 1, в котором

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 или 150 аминокислот;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 или 125 аминокислот;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 аминокислот;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å, а спейсер имеет длину 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75 аминокислот;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å, а спейсер имеет длину 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислот;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å, а спейсер имеет длину 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å, а спейсер имеет длину 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот; или

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å, а спейсер имеет длину 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот.

4. Полинуклеотид по п. 2, в котором

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 450 Å, около 440 Å, около 430 Å, около 420 Å, около 410 Å, около 400 Å, около 390 Å, около 380 Å или около 375 Å;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 375 Å, около 370 Å, около 360 Å, около 350 Å, около 340 Å, около 330 Å, около 320 Å, около 310 Å или около 300 Å;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 10 Å, а спейсер имеет длину около 300 Å, около 290 Å, около 280 Å, около 270 Å, около 260 Å, около 250 Å, около 240 Å, около 230 Å или около 225 Å;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет менее около 15 Å, спейсер имеет длину около 225 Å, около 220 Å, около 210 Å, около 200 Å, около 190 Å, около 180 Å, около 170 Å, около 160 Å, около 150 Å, около 140 Å, около 130 Å, около 120 Å, около 110 Å или около 100 Å;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 15 Å до около 25 Å, а спейсер имеет длину около 100 Å, около 95 Å, около 90 Å, около 85 Å, около 80 Å, около 75 Å, около 70 Å, около 65 Å или около 60 Å;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 25 Å до около 35 Å, а спейсер имеет длину около 60 Å, около 55 Å, около 50 Å и около 45 Å;

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет от около 35 Å до около 45 Å, а спейсер имеет длину около 45 Å, около 40 Å, около 35 Å или около 30 Å; или

расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени составляет более около 45 Å, а спейсер имеет длину около 30 Å, около 25 Å, около 20 Å или около 15 Å.

5. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

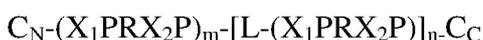
(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

где спейсер содержит аминокислотную последовательность формулы



где (i) спейсер расположен между лиганд-связывающим доменом и

трансмембранным доменом CAR; (ii) спейсер имеет длину по меньшей мере 15 аминокислот; (iii) m является целым числом, выбранным из 0 или 1; (iv) n является целым числом от 1 до 20; (v) L представляет собой последовательность линкерного полипептида; (vi) C_N представляет собой необязательную N-концевую кэпирующую последовательность; (vii) C_C представляет собой необязательную C-концевую кэпирующую последовательность; и (viii) X_1 и X_2 независимо выбраны из цистеина, глицина, аланина или серина.

6. Полинуклеотид по п. 5, в котором спейсер содержит два, три, четыре, пять или шесть мотивов X_1PRX_2P .

7. Полинуклеотид по п. 5, в котором X_1PRX_2P содержит по меньшей мере один цистеин.

8. Полинуклеотид по п. 6, в котором X_1PRX_2P представляет собой SEQ ID NO: 4749 (CPRCP).

9. Полинуклеотид по п. 5, в котором L содержит полипептид SEQ ID NO: 4223 или его фрагмент, или вариант.

10. Полинуклеотид по п. 5, в котором в случае, когда $n > 1$, все L являются идентичными.

11. Полинуклеотид по п. 5, в котором в случае, когда $n > 1$, по меньшей мере один L отличается от другого L .

12. Полинуклеотид по п. 5, в котором C_N содержит полипептид SEQ ID NO: 4088 или его фрагмент, или вариант.

13. Полинуклеотид по п. 5, в котором C_C содержит полипептид SEQ ID NO: 4533 или его фрагмент, или вариант.

14. Полинуклеотид по п. 11, в котором спейсер CAR содержит последовательность формулы



где o является целым числом, равным 0 или 1, и p является целым числом, равным 1, 2 или 3, где CPRCP представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4740, и EPKSCDTPPPCPRCP представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4477.

15. Полинуклеотид по п. 14, в котором спейсер CAR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2813, 2903, 2983, 3358, 3728 и 4477.

16. Полинуклеотид по п. 15, в котором спейсер CAR содержит кэпирующую последовательность C_C , содержащую подпоследовательность полипептида SEQ ID NO: 4533 или его фрагмента или варианта.

17. Полинуклеотид по п. 16, в котором подпоследовательность полипептида SEQ ID NO: 5 представляет собой N-концевую AP.

18. Полинуклеотид по п. 17, в котором спейсер CAR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4833, 4834, 4835, 4836, 4837 и 4838.

19. Полинуклеотид по любому из пп. 15-18, в котором спейсер CAR содержит кэпирующую последовательность C_N, содержащую подпоследовательность полипептида SEQ ID NO: 4088 или его фрагмента, или варианта.

20. Полинуклеотид по п. 19, в котором спейсер CAR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4833.

21. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4841.

22. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере

мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4839.

23. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

- (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;
- (ii) трансмембранный домен;
- (iii) внутриклеточный домен; и
- (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального фрагмента,

где спейсер содержит аминокислотную последовательность формулы

$(EX_3KX_4X_5X_6X_7DTX_8X_9X_{10}TCPRCP)_q$ SEQ ID NO: 4812

где q является целым числом от 1 до 10, и где: X₃ представляет собой L или P; X₄ представляет собой T или S; X₅ представляет собой P или C; X₆ представляет собой L или отсутствует; X₇ представляет собой G или отсутствует; X₈ представляет собой T или P; X₉ представляет собой H или P; и X₁₀ представляет собой T или P.

24. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

- (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;
- (ii) трансмембранный домен;
- (iii) внутриклеточный домен; и
- (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина человека, или ее функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность A SEQ ID NO: 4466 и/или по меньшей мере одну аминокислотную последовательность B SEQ ID NO: 4477, при этом аминокислотная последовательность спейсера CAR соответствует формуле A, B, AB, ABB, ABVB, AVVBV, AVVVV, AA, AAA, AAAA, AAAAA, BB, BBV, BVVBV или BVVVV.

25. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

- (i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;
- (ii) трансмембранный домен;
- (iii) внутриклеточный домен; и
- (iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их

функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 11**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 11**.

26. Полинуклеотид по любому из пп. 5-25, в котором спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG3, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG3.

27. Полинуклеотид по п. 26, в котором N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG3, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG3, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в **Таблице 12**.

28. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 1.

29. Полинуклеотид по п. 28, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2015, 1889, 1768 и 4852; и любой их комбинации.

30. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в Таблице 1, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 1**.

31. Полинуклеотид по любому из пп. 28-30, в котором спейсер CAR дополнительно содержит (i) N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgD, и/или (ii) C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgD.

32. Полинуклеотид по п. 31, в котором аминокислоты C-концевого домена последовательности CH1 и CH2 IgD и/или аминокислоты N-концевого домена последовательности CH1 и CH2 IgD содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 2**.

33. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2560.

34. Полинуклеотид по п. 33, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 3**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 3**.

35. Полинуклеотид по п. 33, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по

меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4847, 4845, 4846, 2560 и 4844; и любой их комбинации.

36. Полинуклеотид по любому из пп. 33-35, в котором спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA1, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA1.

37. Полинуклеотид по п. 36, в котором N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA1, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA1, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 4**.

38. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 4848.

39. Полинуклеотид по п. 38, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4523, 4850, 2713, 4524 и 4525; и любой их комбинации.

40. Полинуклеотид по п. 38 или п. 39, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 5**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 5**.

41. Полинуклеотид по любому из пп. 38-40, в котором спейсер дополнительно

содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA2, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA2.

42. Полинуклеотид по п. 41, в котором N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgA2, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgA2, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 6**.

43. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2723 или SEQ ID NO: 4843.

44. Полинуклеотид по п. 43, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4839, 4840 и 4843; и любой их комбинации.

45. Полинуклеотид по п. 43 или п. 44, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 7**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 7**.

46. Полинуклеотид по пп. 43-45, в котором спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG1, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG1.

47. Полинуклеотид по п. 46, в котором N-концевая подпоследовательность,

содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена СН1 IgG1, и/или С-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена СН2 IgG1, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 8**.

48. Полинуклеотид, кодирующий САР, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер САР, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 2768 или SEQ ID NO: 4842.

49. Полинуклеотид по п. 48, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4842.

50. Полинуклеотид по п. 48 или п. 49, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 9А**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 9А**.

51. Полинуклеотид по п. 47 или п. 48, в котором спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена СН1 IgG2, и/или С-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена СН2 IgG2.

52. Полинуклеотид по п. 51, в котором N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот С-концевого домена СН1 IgG2, и/или С-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена СН2 IgG2, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 10А**.

53. Полинуклеотид, кодирующий САР, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 4926.

54. Полинуклеотид по п. 53, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4830, 4831 и 4832; и любой их комбинации.

55. Полинуклеотид по п. 53 или п. 54, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 9В**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 9В**.

56. Полинуклеотид по пп. 53-55, в котором спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG2, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2.

57. Полинуклеотид по п. 56, в котором N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgG2, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgG2, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 10В**.

58. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и

трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 4374.

59. Полинуклеотид по п. 58, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4856.

60. Полинуклеотид по п. 58 или п. 59, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 15**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 15**.

61. Полинуклеотид по любому из пп. 50-60, в котором спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgE, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgE.

62. Полинуклеотид по п. 61, в котором N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgE, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgE, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 16**.

63. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий

(i) антигенсвязывающий домен, который связывается с эпитопом опухолевого антигена, экспрессированного на клетке-мишени;

(ii) трансмембранный домен;

(iii) внутриклеточный домен; и

(iv) спейсер CAR, расположенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека или их функционального фрагмента,

при этом спейсер содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере пять, шесть или семь последовательных аминокислот SEQ ID NO: 4857.

64. Полинуклеотид по п. 63, в котором спейсер содержит аминокислотную

последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4858, 4959 и 4857; и любой их комбинации.

65. Полинуклеотид по п. 63 или п. 64, в котором спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 17**, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в **Таблице 17**.

66. Полинуклеотид по любому из пп. 63-65, в котором спейсер дополнительно содержит N-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgM, и/или C-концевую подпоследовательность, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgM.

67. Полинуклеотид по п. 68, в котором N-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот C-концевого домена CH1 IgM, и/или C-концевая подпоследовательность, содержащая 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот N-концевого домена CH2 IgM, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в **Таблице 18**.

68. Полинуклеотид по пп. 1-67, в котором спейсер CAR содержит необязательный линкер L1 и/или необязательный линкер L2.

69. Полинуклеотид по пп. 1-67, в котором необязательный линкер L1 и/или необязательный линкер L2 представляют собой гибкий линкер.

70. Полинуклеотид по п. 68 или п. 69, в котором необязательный линкер L1 и/или необязательный линкер L2 имеют длину от 1 до 100 аминокислот.

71. Полинуклеотид по п. 70, в котором длина линкера L1 составляет от 1 до 10 аминокислот.

72. Полинуклеотид по п. 68 или п. 71, в котором линкер L1 содержит линкер Gly-Ser.

73. Полинуклеотид по п. 72, в котором линкер L1 содержит последовательность GGGSG (SEQ ID NO: 4818) или последовательность GGGGSG (SEQ ID NO: 5088).

74. Полинуклеотид по любому из пп. 68-73, в котором длина линкера L2 составляет от 1 до 10 аминокислот.

75. Полинуклеотид по любому из пп. 68-74, в котором L2 содержит последовательность PGG.

76. Полинуклеотид по пп. 1-75, в котором шарнирная область иммуноглобулина

человека получена из IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 или IgM.

77. Полинуклеотид по пп. 1-76, в котором функциональный фрагмент шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека содержит

- (a) внутреннюю подпоследовательность шарнирной и/или константной области;
- (b) С-концевую подпоследовательность шарнирной и/или константной области;
- (c) N-концевую подпоследовательность шарнирной и/или константной области;
- (d) шарнирную область, которая удлинена на 1-10 аминокислот в направлении N-концевого домена CH1 и/или С-концевого домена CH2;
- (e) подпоследовательность шарнирной области, которая удлинена на 1-10 аминокислот в направлении N-концевого домена CH1;
- (f) подпоследовательность шарнирной области, которая удлинена на 1-10 аминокислот в направлении С-концевого домена CH2;
- (g) последовательность, содержащую 2 или более повторов (a)-(f);
- (h) комбинацию (a)-(g), соответствующую одной и той же шарнирной и/или константной области;
- (i) комбинацию (a)-(g), соответствующую разным шарнирным и/или константным областям; или
- (j) любую их комбинацию.

78. Полинуклеотид по любому из пп. 1-77, в котором расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени оценивают с помощью рентгеновской кристаллографии, ЯМР или крио-ЭМ структуры.

79. Полинуклеотид по любому из пп. 1-78, в котором расстояние между эпитопом и поверхностью мембраны клетки-мишени оценивают с использованием метода резонансного переноса энергии флуоресценции.

80. Полинуклеотид по любому из пп. 1-79, в котором CAR индуцирует повышенную экспрессию IFN γ и/или IL-2 по сравнению с соответствующим CAR, содержащим эталонный спейсер.

81. Полинуклеотид по любому из пп. 1-80, в котором CAR индуцирует увеличение экспрессии IFN γ в по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11 раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз по сравнению с соответствующим CAR, содержащим эталонный спейсер.

82. Полинуклеотид по любому из пп. 1-81, в котором CAR индуцирует увеличение экспрессии IL-2 в по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 11

раз, по меньшей мере около 12 раз, по меньшей мере около 13 раз, по меньшей мере около 14 раз, около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз по сравнению с соответствующим CAR, содержащим эталонный спейсер.

83. Полинуклеотид по любому из пп. 1-82, в котором антигенсвязывающий домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом на опухолевом антигене.

84. Полинуклеотид по любому из пп. 1-84, в котором опухолевый антиген включает ROR1, HER2, AFP, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFR ν III, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелин, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюис Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатный рецептор альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазу, PAP, ELF2M, эфрин B2, рецептор IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназу, EphA2, фукозил GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатный рецептор альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловую кислоту, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WTI, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумин, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белок спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственный антиген 1, p53, мутант p53, простеин, сурвивин и теломеразу, PCTA-1/галектин 8, MelanA/MART1, мутант Ras, hTERT, точки разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитый ген ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогеновый рецептор, циклин B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TE51, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2, кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, внеклеточную часть белка APRIL и любые их комбинации.

85. Полинуклеотид по любому из пп. 1-84, в котором опухолевый антиген включает ROR1, CD19 или Her2.

86. Полинуклеотид по любому из пп. 1-85, в котором антигенсвязывающий домен содержит антитело к ROR1 или его антигенсвязывающую часть.

87. Полинуклеотид по п. 86, в котором антигенсвязывающий домен перекрестно конкурирует с антителом R11, антителом R12 или антителом 2A2.

88. Полинуклеотид по п. 86 или п. 87, в котором антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом, что и антитело R11, антитело R12 или антитело 2A2.

89. Полинуклеотид по п. 86 или п. 87, в котором антигенсвязывающий домен содержит CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2.

90. Полинуклеотид по п. 89, в котором антигенсвязывающий домен дополнительно содержит CDR1 VH и CDR2 VH.

91. Полинуклеотид по п. 90, в котором CDR1 VH включает CDR1 VH антитела

R11, антитела R12 или антитела 2A2, и/или CDR2 VH включает CDR2 VH антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2.

92. Полинуклеотид по любому из пп. 89-91, в котором антигенсвязывающий домен дополнительно содержит CDR1 варибельной области легкой цепи (VL), CDR2 VL и/или CDR3 VL.

93. Полинуклеотид по п. 92, в котором CDR1 VL включает CDR1 VL антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2, CDR2 VL включает CDR2 VL антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2, и/или CDR3 VL включает CDR3 VL антитела R11, антитела R12 или антитела 2A2.

94. Полинуклеотид по п. 87 или п. 88, в котором антигенсвязывающий домен содержит:

(i) CDR1 VH с SEQ ID NO: 4888; CDR2 VH с SEQ ID NO: 4889; и CDR3 VH с SEQ ID NO: 4890; и/или CDR1 VL с SEQ ID NO: 4892; CDR2 VL с SEQ ID NO: 4893; и CDR3 VL с SEQ ID NO: 4894;

(ii) CDR1 VH с SEQ ID NO: 4896; CDR2 VH с SEQ ID NO: 4897; и CDR23 VH с SEQ ID NO: 4898; и/или CDR1 VL с SEQ ID NO: 4900; CDR2 VL с SEQ ID NO: 4901; и CDR3 VL с SEQ ID NO: 4902; или

(iii) CDR1 VH с SEQ ID NO: 4904; CDR2 VH с SEQ ID NO: 4905; и CDR23 VH с SEQ ID NO: 4906; и/или CDR1 VL с SEQ ID NO: 4908; CDR2 VL с SEQ ID NO: 4909; и CDR3 VL с SEQ ID NO: 4910.

95. Полинуклеотид по п. 87 или п. 88, в котором антигенсвязывающий домен содержит варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL), и при этом:

(i) VH содержит SEQ ID NO: 4887; или VL содержит SEQ ID NO: 4891;

(ii) VH содержит SEQ ID NO: 4895; или VL содержит SEQ ID NO: 4899; или

(iii) VH содержит SEQ ID NO: 4903; или VL содержит SEQ ID NO: 4907.

96. Полинуклеотид по любому из пп. 87 или 88, в котором антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую SEQ ID NO: 4895, и VL, содержащую SEQ ID NO: 4899; и при этом спейсер состоит из SEQ ID NO: 4830.

97. Полинуклеотид по любому из пп. 1-96, в котором CAR сконструирован как стандартный CAR, разделенный CAR, CAR с выключенным переключателем, CAR с включенным переключателем, CAR первого поколения, CAR второго поколения, CAR третьего поколения или CAR четвертого поколения.

98. Полинуклеотид по любому из пп. 1-97, в котором антигенсвязывающий домен представляет собой IgNAR, Fab, Fab', F(ab)'₂, F(ab)'₃, Fv, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), бис-scFv, (scFv)₂, миниантитело, диатело, триатело, тетратело, интратело, стабилизированный дисульфидом белок Fv (dsFv), моноантитело, наноантитело, аффитело, DARPin, монотело, аднектин, альфатело или разработанный связывающий компонент.

99. Полинуклеотид по любому из пп. 1-98, в котором внутриклеточный домен CAR

представляет собой сигнальный домен, полученный из CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

100. Полинуклеотид по любому из пп. 1-99, в котором CAR дополнительно содержит костимулирующий домен, полученный из 2B4, HVEM, ICOS, LAG3, DAP10, DAP12, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, ICOS (CD278), глюкокортикоид-индуцированного рецептор фактора некроза опухоли (GITR), лимфоцитарного функционального антигена-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C или B7-H3.

101. Полинуклеотид по любому из пп. 1-100, в котором полинуклеотид представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

102. Полинуклеотид по любому из пп. 1-101, в котором трансмембранный домен связан с внутриклеточным доменом посредством линкера.

103. Полинуклеотид по любому из пп. 1-102, в котором CAR представляет собой биспецифический CAR.

104. Полинуклеотид по любому из пп. 1-102, в котором CAR представляет собой индуцируемый CAR.

105. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 1-104, функционально связанный с регуляторным элементом.

106. Вектор по п. 105, который представляет собой вирусный вектор, вектор млекопитающего или бактериальный вектор.

107. Вектор по п. 105 или п. 106, который представляет собой ретровирусный вектор.

108. Вектор по любому из пп. 105-107, в котором вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, лентивирусного вектора, вектора на основе вируса Сендай, бакуловирусного вектора, вектора на основе вируса Эпштейна - Барр, паповавирусного вектора, вектора на основе вируса осповакцины, вектора на основе вируса простого герпеса, гибридного вектора и вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

109. Вектор по п. 108, который представляет собой лентивирус.

110. Композиция, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 1-104 или вектор по любому из пп. 105-109.

111. Набор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 1-104, вектор по любому из пп. 105-109 или композицию по п. 110.

112. CAR, кодируемый одной или более полинуклеотидными последовательностями по любому из пп. 1-104, или вектором по любому из пп. 105-109.

113. Клетка, генетически модифицированная для экспрессии CAR, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 1-104 или вектор по любому из пп. 105-109.

114. Клетка по п. 113, причем клетка представляет собой Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK), естественную Т-клетку-киллер (NKT), ILC-клетку, макрофаг или антигенпрезентирующую клетку.

115. Композиция, содержащая CAR по п. 112 или клетку по п. 113 или п. 114.

116. Композиция по п. 110 или п. 115 для лечения субъекта, нуждающегося в CAR-терапии.

117. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по п. 113 или 114, или композицию по п. 110 или п. 115, для лечения рака у нуждающегося в этом субъекта.

118. Набор, содержащий CAR по п. 112, клетку по п. 113 или п. 114, композицию по п. 110 или п. 115 или фармацевтическую композицию по п. 117.

119. Применение полинуклеотида по любому из пп. 1-104, вектора по любому из пп. 105-109, композиции по п. 110, набора по п. 111, CAR по п. 112, клетки по п. 113 или п. 114, композиции по п. 115 или п. 116, фармацевтической композиции по п. 117 или набора по п. 118 для изготовления лекарственного препарата для лечения рака у нуждающегося в этом субъекта.

120. Способ стимуляции опосредованного T-клетками иммунного ответа на популяцию клеток-мишеней или ткань у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клеток по п. 113 или п. 114.

121. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клеток по п. 113 или п. 114.

122. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества клеток по п. 113 или п. 114.

123. Способ получения популяции клеток для терапии, включающий трансдукцию популяции клеток, выделенных от субъекта, полинуклеотидом по любому из пп. 1-104 или вектором по любому из пп. 105-109.

124. Способ по п. 123, в котором трансдукция включает культивирование клетки в подходящих условиях.

125. Способ получения персистирующей популяции генетически сконструированных клеток у субъекта, у которого диагностирован рак, причем способ включает введение субъекту клетки, генетически сконструированной для экспрессии CAR по п. 112.

126. Способ увеличения популяции генетически сконструированных клеток у субъекта, у которого диагностирован рак, причем способ включает введение субъекту клетки, генетически сконструированной для экспрессии CAR по п. 112.

127. Способ по любому из пп. 120-126, в котором клетка представляет собой T-клетку.

128. Способ по п. 127, в котором клетка представляет собой аутологичную T-клетку.

129. Способ по любому из пп. 120-128, в котором субъект представляет собой человека.

130. Способ улучшения одного или более свойств CAR-терапии, включающий вставку спейсера CAR между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным

доменом CAR, причем спейсер CAR представляет собой спейсер, указанный в полинуклеотиде по любому из пп. 1-104.

131. Способ улучшения одного или более свойств CAR-терапии, включающий вставку спейсера CAR между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом CAR, причем спейсер CAR представляет собой спейсер, указанный в полинуклеотиде по любому из пп. 1-104, при этом спейсер расположен между лигандсвязывающим доменом и трансмембранным доменом.

132. Способ по п. 131, в котором спейсер CAR представляет собой спейсер, указанный в полинуклеотидах по любому из пп. 1-104.

133. Способ по п. 131 или п. 132, в котором одно или более улучшенных свойств CAR-терапии представляют собой повышенную секрецию одного или более цитокинов.

134. Способ по п. 133, в котором секреция цитокинов, индуцированная CAR, увеличивается по сравнению с секрецией, наблюдаемой после введения соответствующего CAR, содержащего эталонный спейсер.

135. Способ по п. 133 или п. 134, в котором цитокин представляет собой интерлейкин.

136. Способ по п. 135, в котором интерлейкин представляет собой интерлейкин-2.

137. Способ по любому из пп. 133-136, в котором цитокин представляет собой интерферон.

138. Способ по п. 137, в котором интерферон представляет собой интерферон-гамма.

139. Способ конструирования спейсера CAR, включающий измерение расстояния между эпитопом-мишенью и поверхностью клетки-мишени, причем последовательность спейсера представляет собой шарнирную последовательность Ig, ее подпоследовательность или их комбинацию.

140. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5049, 5050 или 5051.

141. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность, включающую от N-конца к C-концу (i) сигнальный пептид с SEQ ID NO:4874, (ii) scFv с SEQ ID NO:4875, (iii) линкер с SEQ ID NO:4818, (iv) спейсер, выбранный из группы, состоящей из спейсера 1 (SEQ ID NO:4830), спейсера 15 (SEQ ID NO:4843) и спейсера 21 (SEQ ID NO:4849), (v) трансмембранный домен с SEQ ID NO: 4868, (vi) костимулирующий домен 4-1BB с SEQ ID NO: 4869, (vii) домен CD3z с SEQ ID NO: 4870, (viii) домен P2A с SEQ ID NO:4871, и (ix) домен EGFRt с SEQ ID NO:4872.

142. Полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность, включающую от N-конца к C-концу (i) сигнальный пептид с SEQ ID NO:4874, (ii) scFv с SEQ ID NO:4875, (iii) линкер с SEQ ID NO:4818, (iv) спейсер CAR, содержащий аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной и/или константной области иммуноглобулина человека, или их функционального фрагмента, (v) трансмембранный домен с SEQ ID NO:4868, (vi) костимулирующий домен 4-1BB с SEQ

ID NO:4869, (vii) домен CD3z с SEQ ID NO:4870, (viii) домен P2A с SEQ ID NO:4871 и (ix) домен EGFRt с SEQ ID NO:4872, при этом общая длина линкера (iii) и спейсера CAR (iv) составляет от около 35 Å до около 55 Å.

143. Полинуклеотид по п. 142, в котором общая длина линкера (iii) и спейсера CAR (iv) составляет около 35 Å, около 40 Å, около 45 Å, около 50 Å или около 55 Å.

144. Полинуклеотид по п. 142, в котором общая длина линкера (iii) и спейсера CAR (iv) составляет от около 40 Å до около 50 Å.

145. Полинуклеотид по п. 142, в котором общая длина линкера (iii) и спейсера CAR (iv) составляет около 45 Å.

146. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 140-145.

147. Композиция, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 140-145 или вектор по п. 146.

148. Набор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 140-145, вектор по п. 146 или композицию по п. 147.

149. CAR, кодируемый одной или более полинуклеотидными последовательностями, содержащими полинуклеотид по любому из пп. 140-145 или вектор по п. 146.

150. Клетка, генетически модифицированная для экспрессии CAR, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 140-145 или вектор по п. 146.

151. Композиция, содержащая CAR по п. 149 или клетку по п. 150.

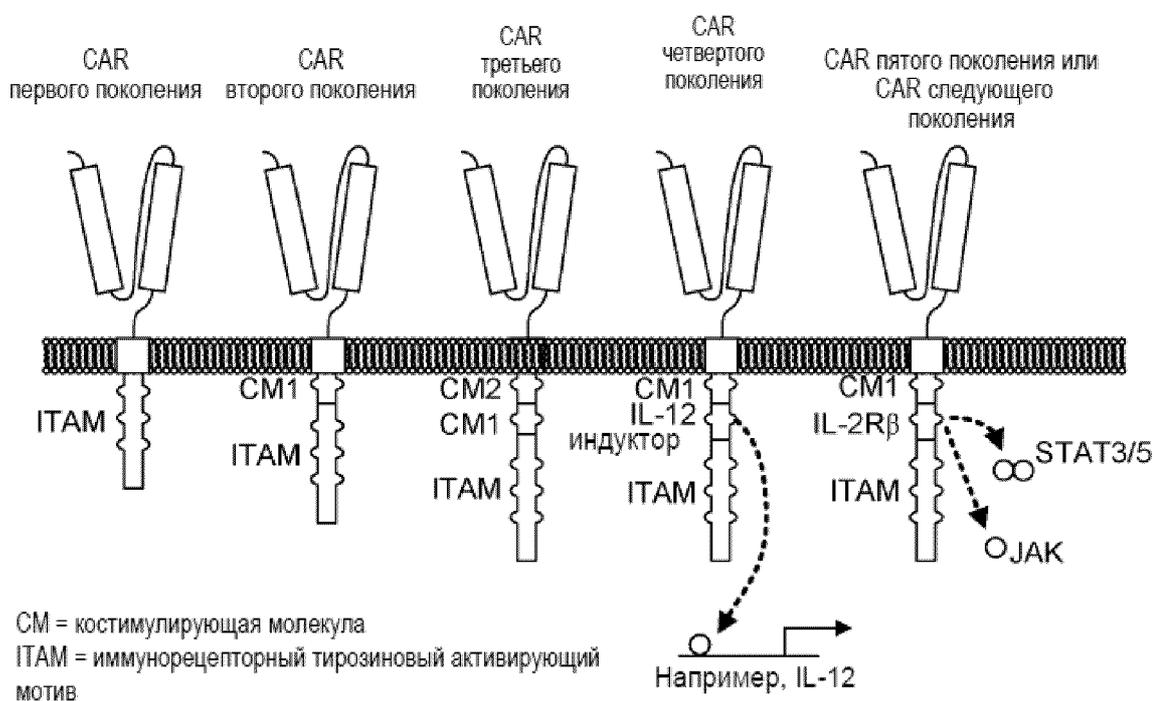
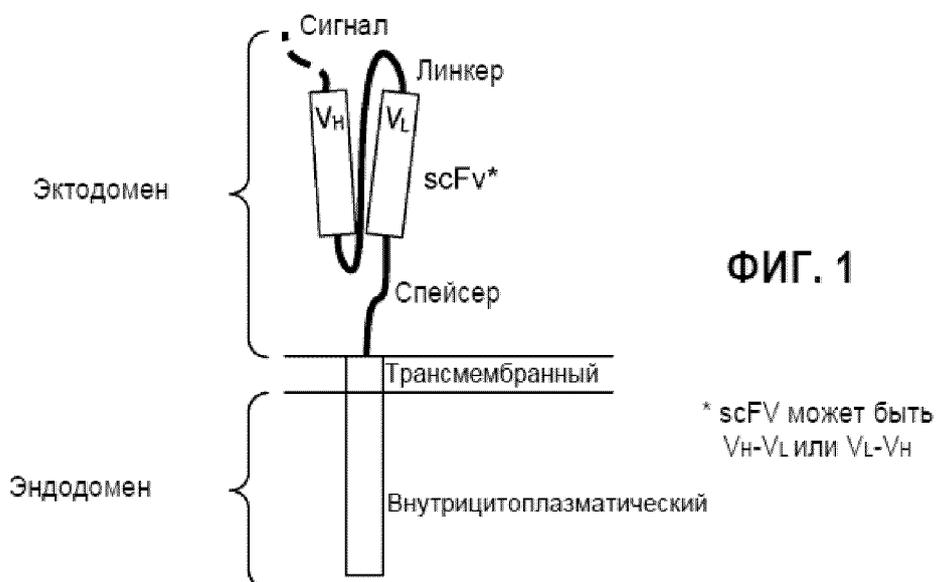
152. Композиция по п. 147 или п. 151 для лечения субъекта, нуждающегося в CAR-терапии.

153. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по п. 150, или композицию по п. 151 или п. 152, для лечения рака у нуждающегося в этом субъекта.

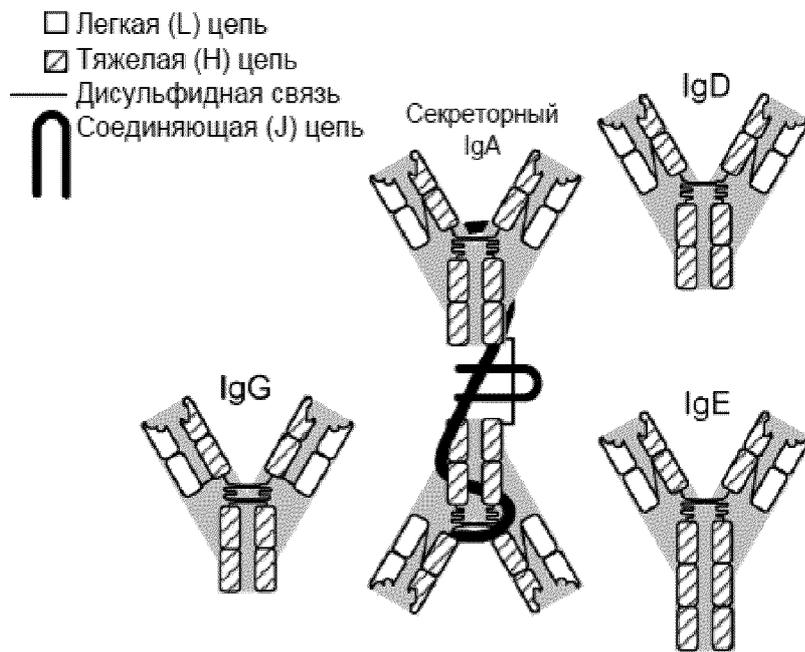
154. Набор, содержащий CAR по п. 149, клетку по п. 150, композицию по п. 151 или п. 152 или фармацевтическую композицию по п. 153.

По доверенности

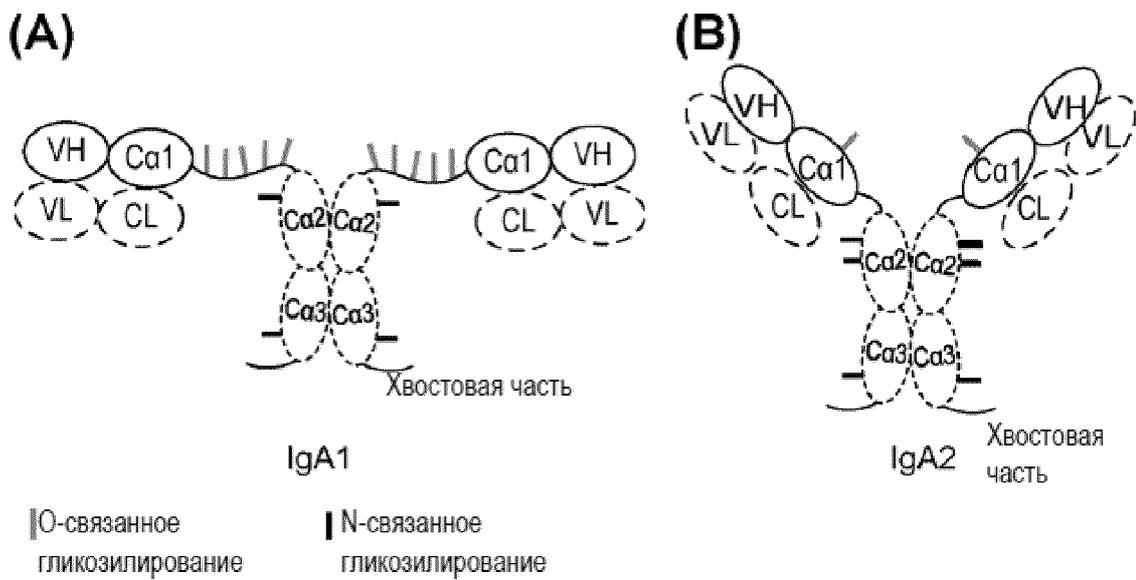
1/149



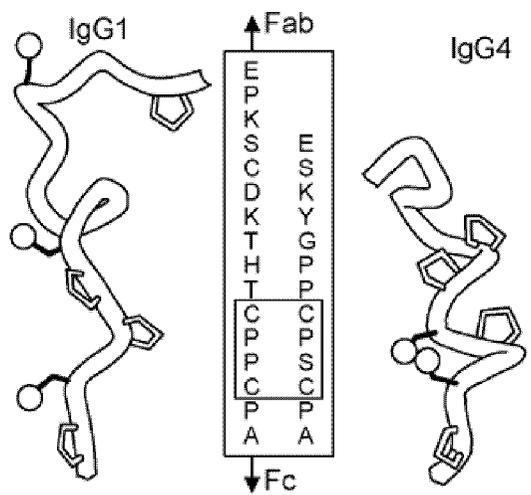
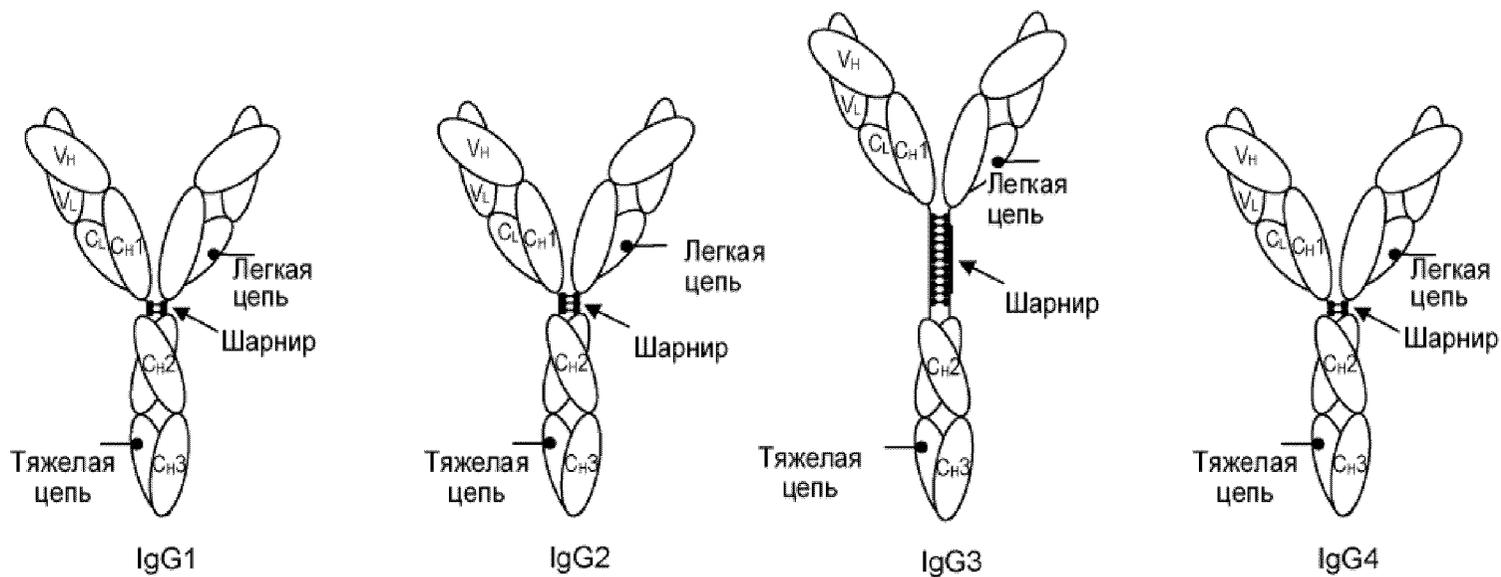
ФИГ. 2



ФИГ. 3

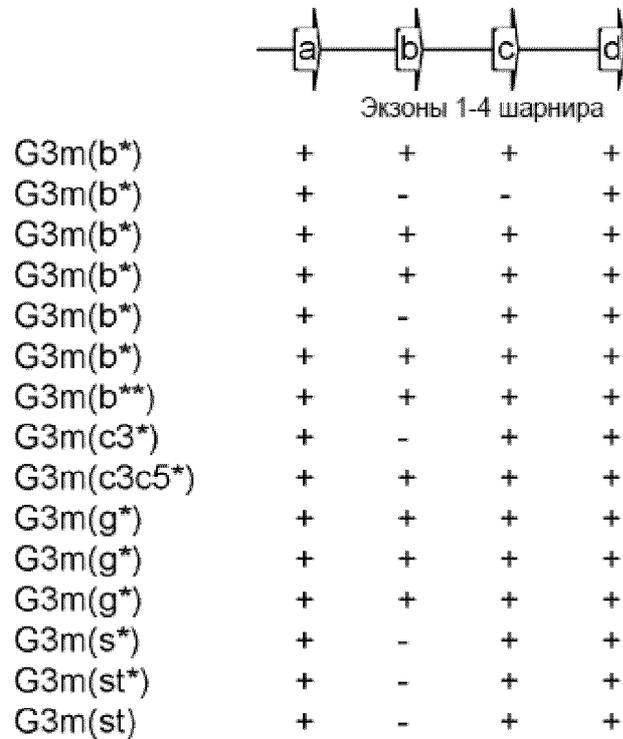


ФИГ. 4



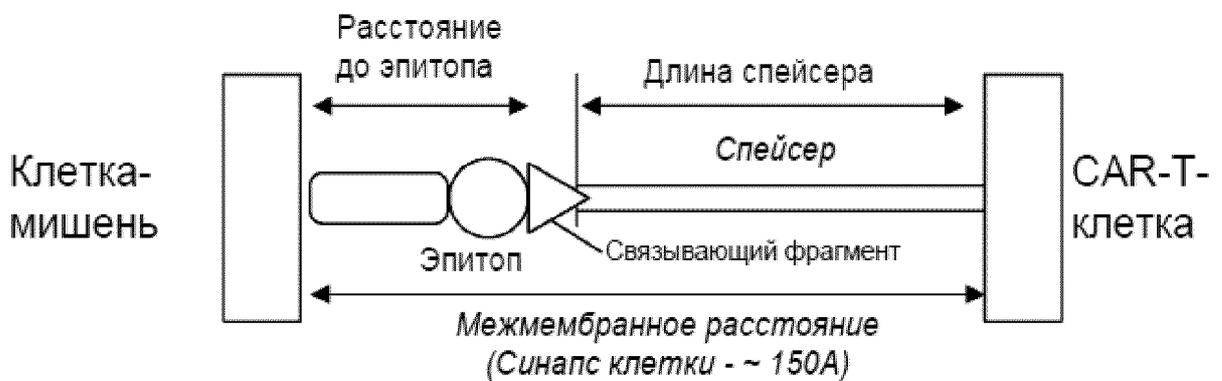
	217		220								
IgG1	P	K	S	...	C	D K T H T	C	F	P	C	
IgG2	R	K	C	...	C	V E	...	C	F	P	C
IgG3	P	C	P	R	C	P E P K S	...	C	F	X	C
IgG4	S	K	Y	...	G	P P	...	C	F	S	C

ФИГ. 5

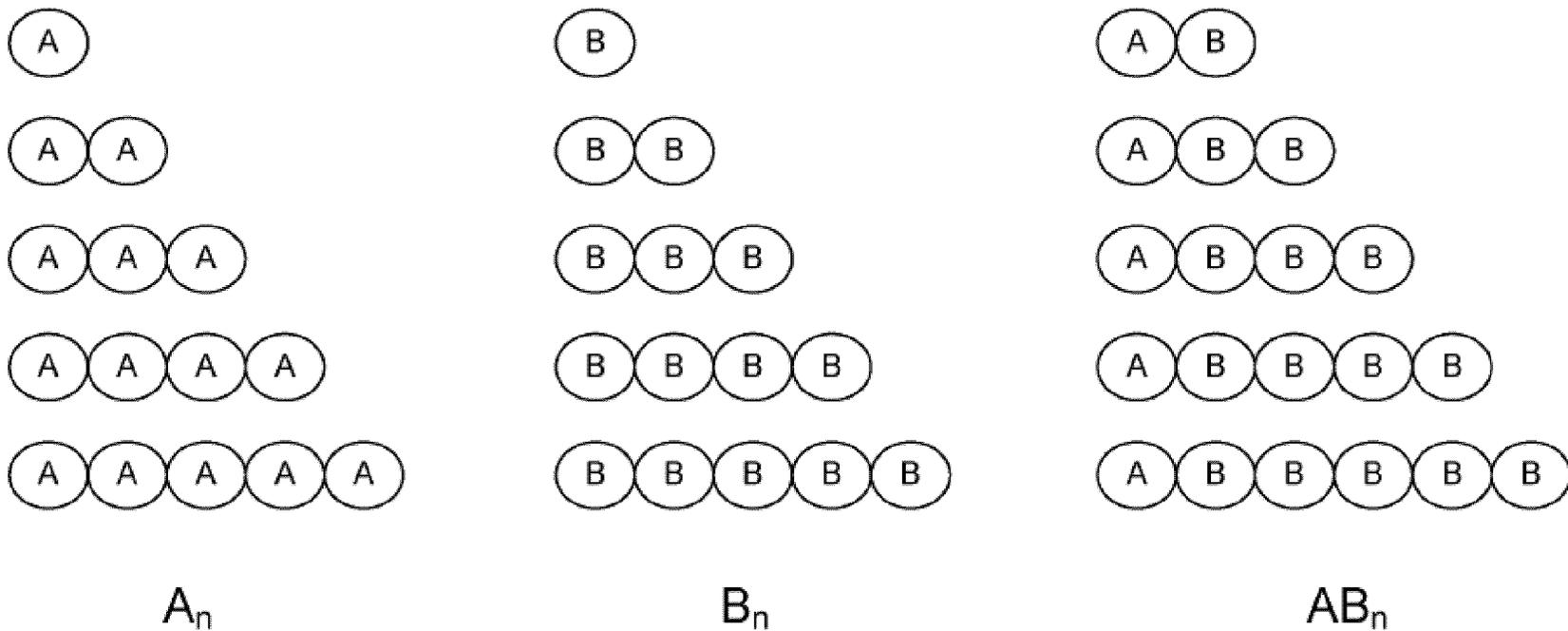


ФИГ. 6

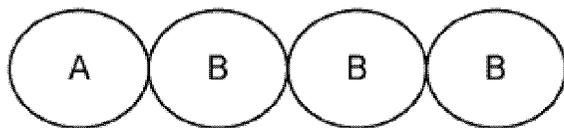
Более короткий Э.Д. → Более длинный спейсер для достижения эпитопа



ФИГ. 7

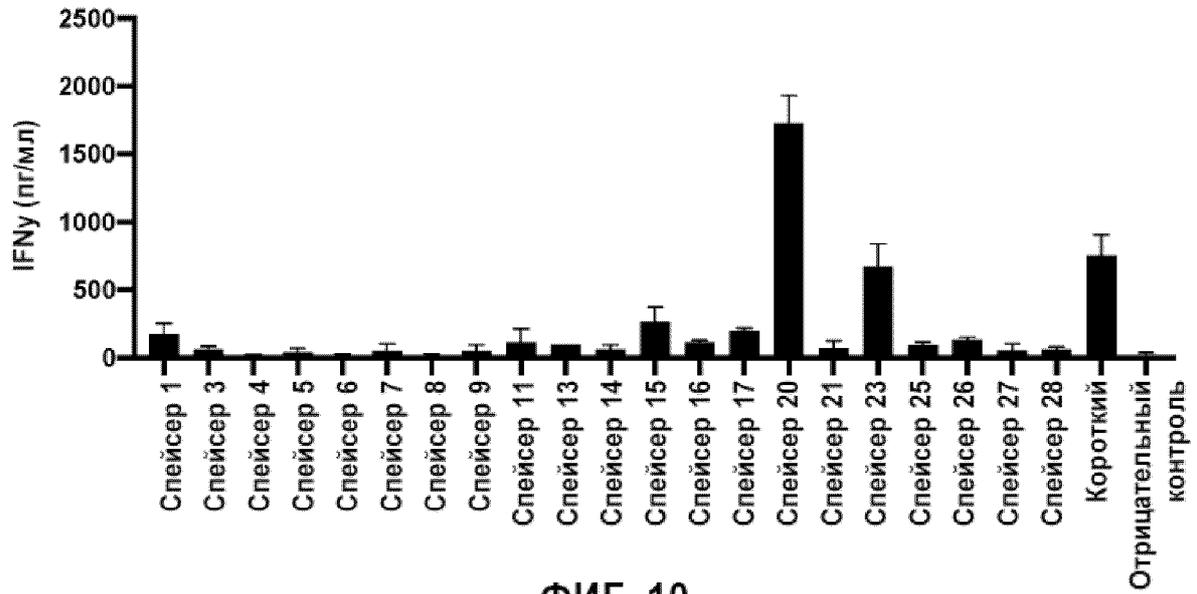


n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20

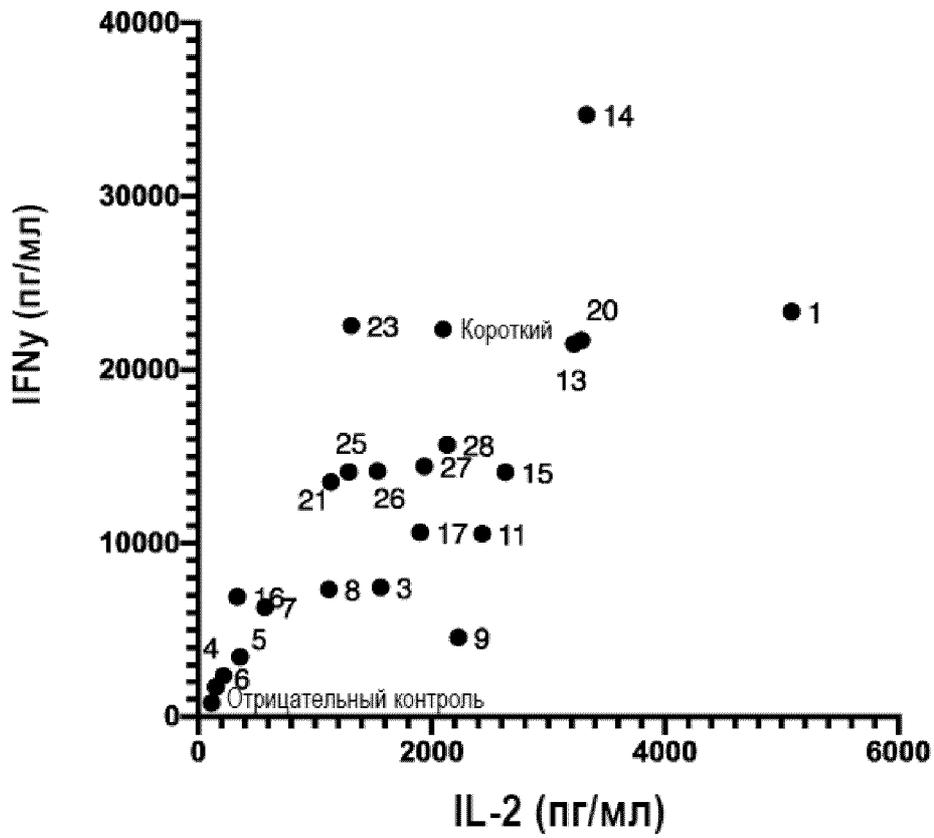


Нативный шарнир IgG3

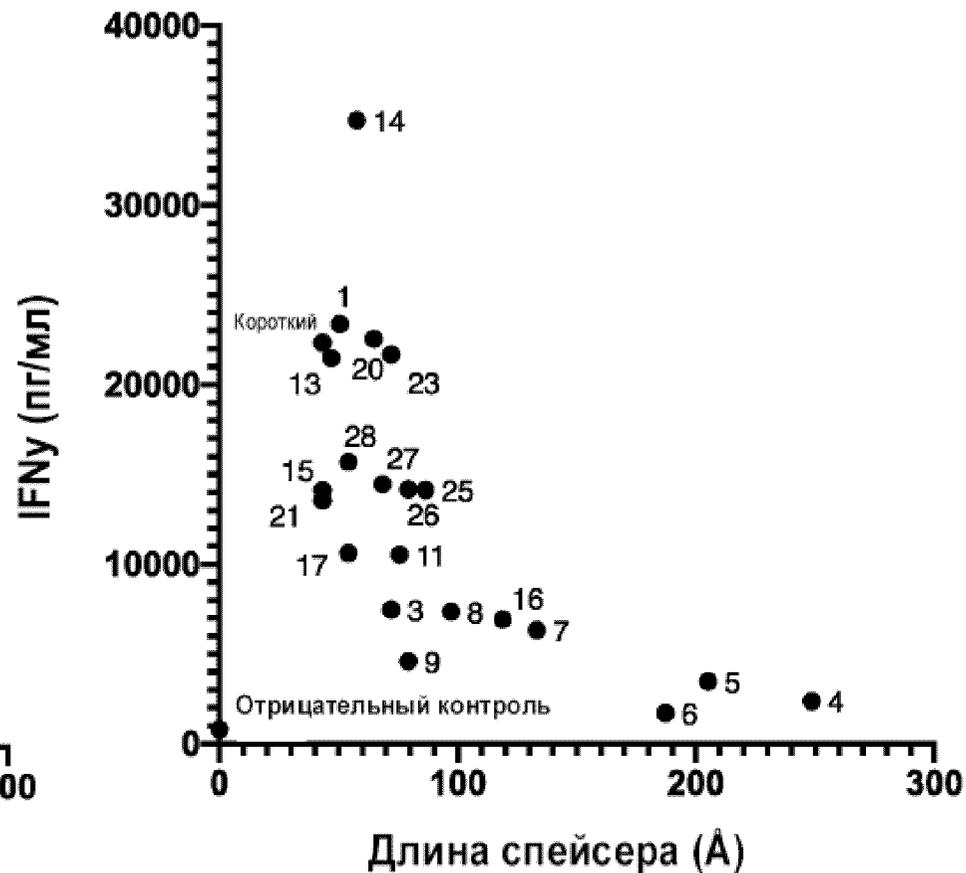
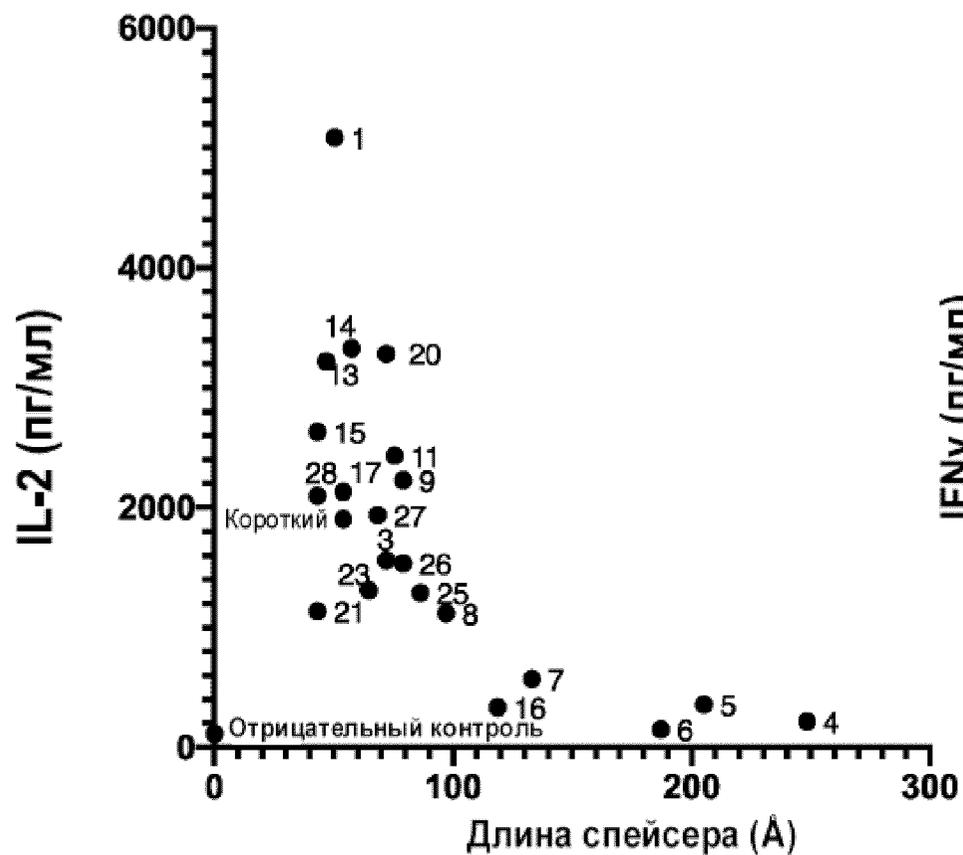
ФИГ. 8



ФИГ. 10

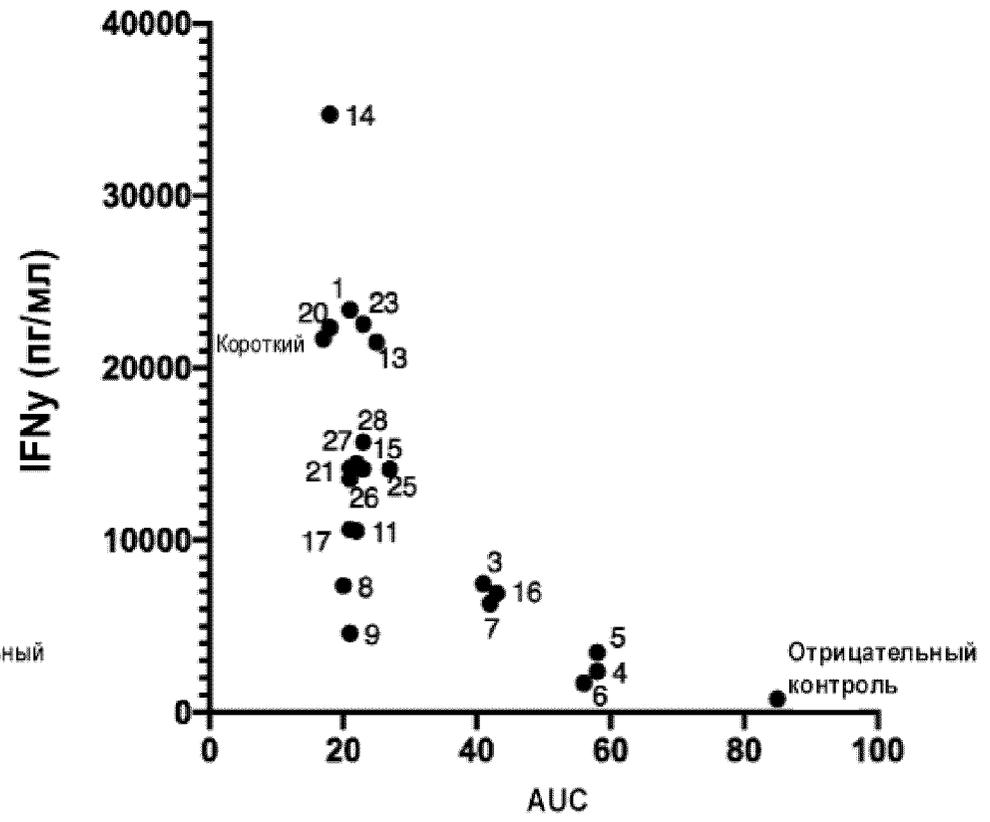
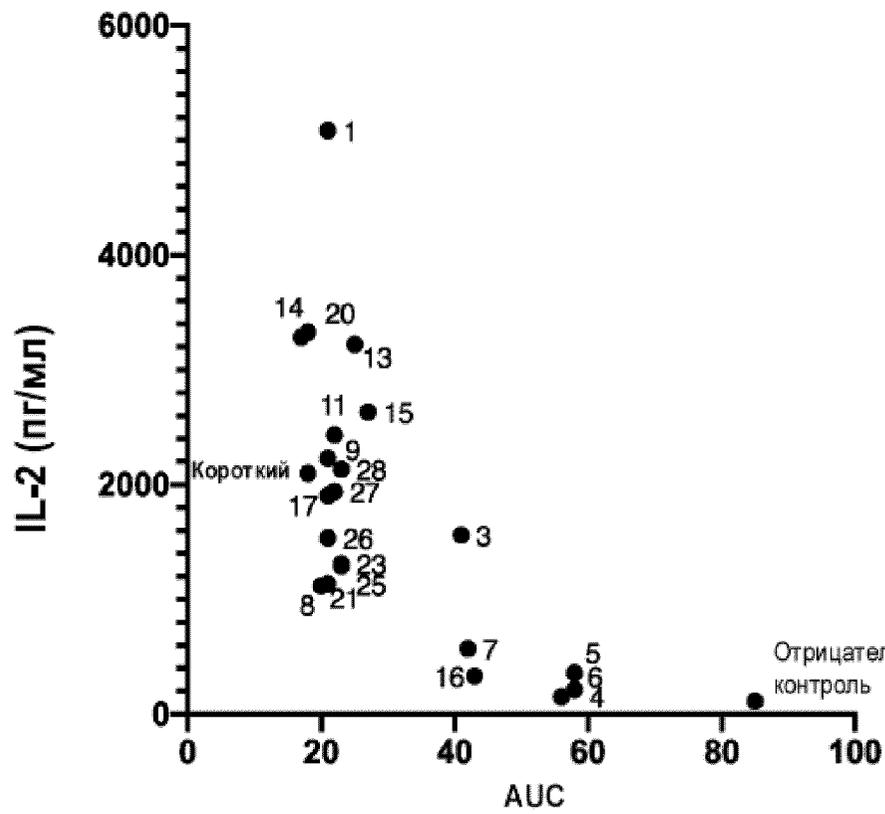


ФИГ. 11А



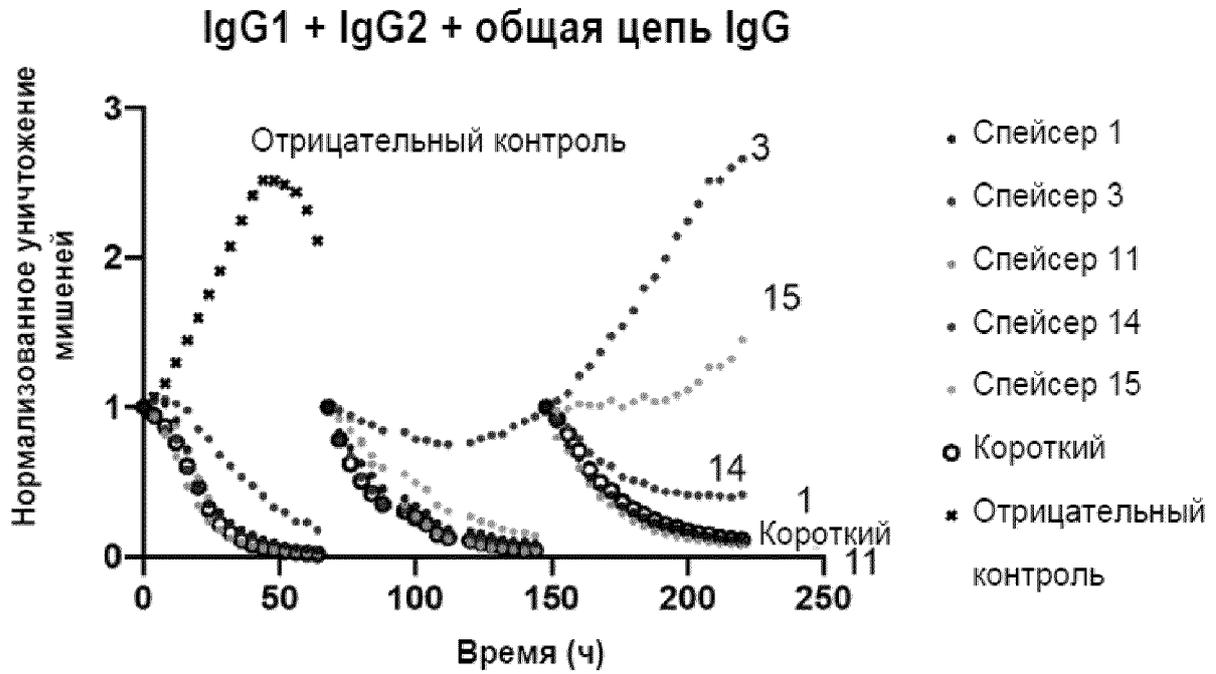
8/149

ФИГ. 11В

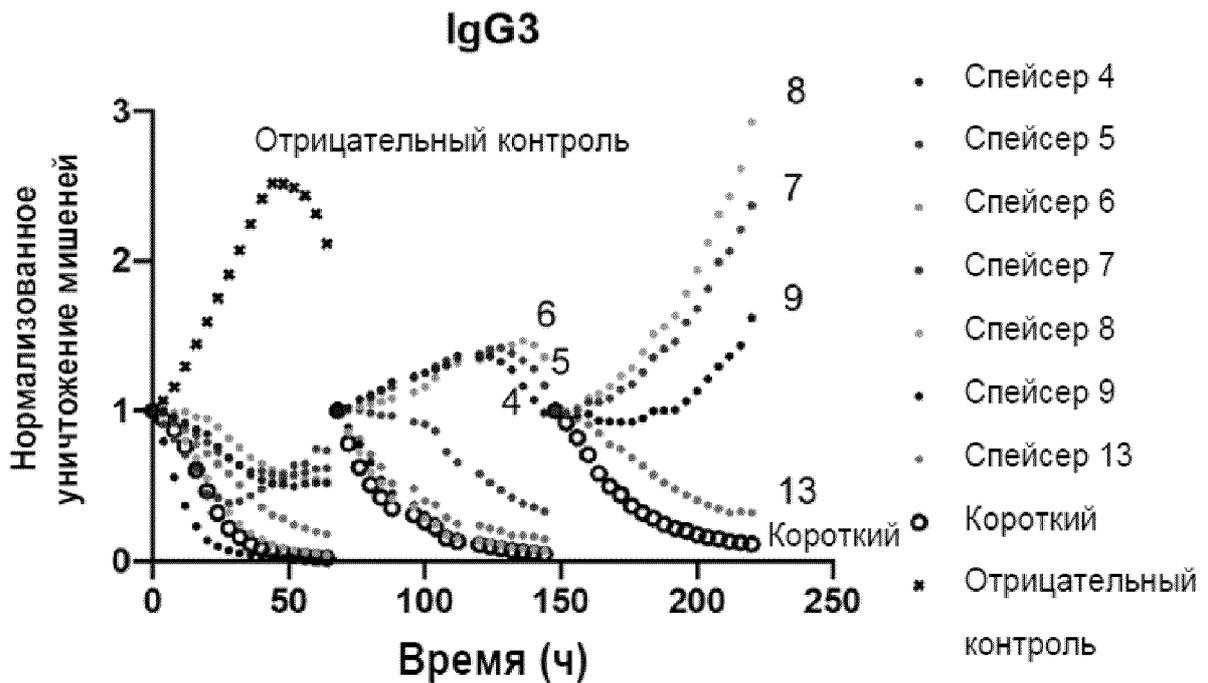


9/149

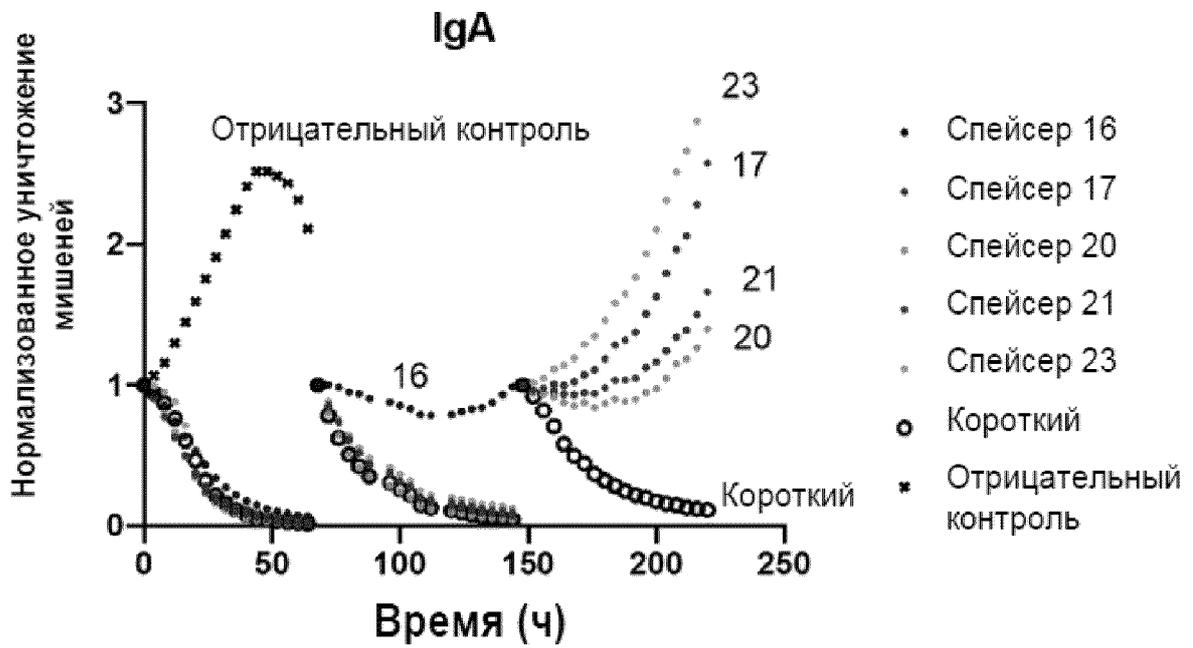
ФИГ. 11С



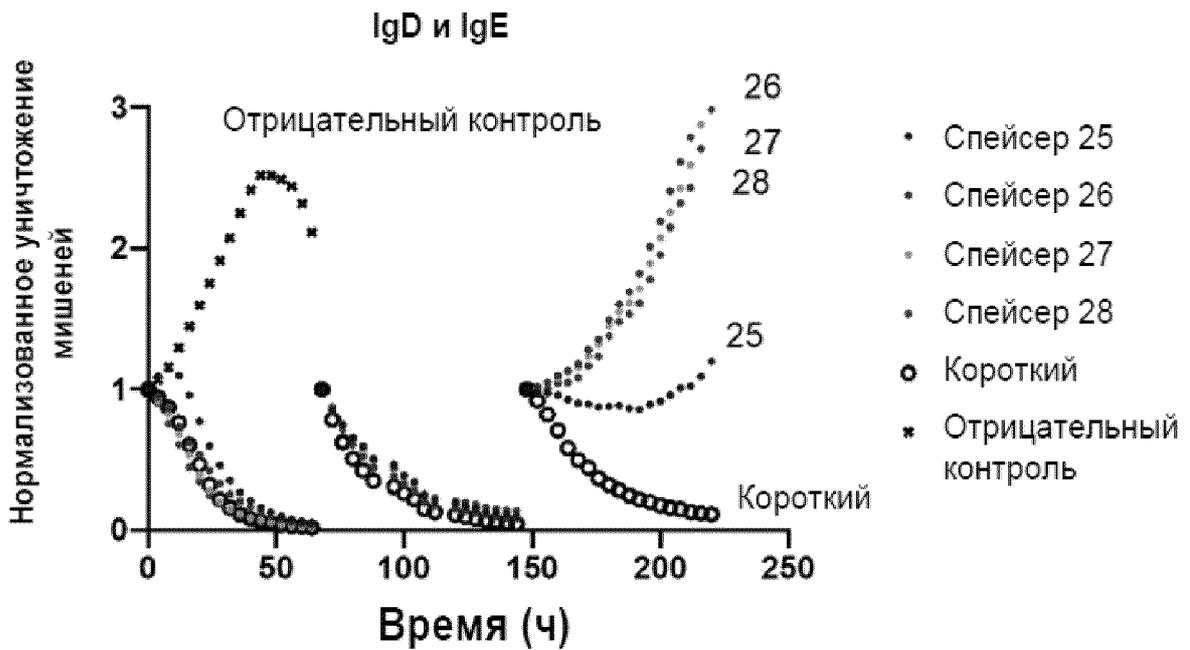
ФИГ. 12А



ФИГ. 12В



ФИГ. 12С



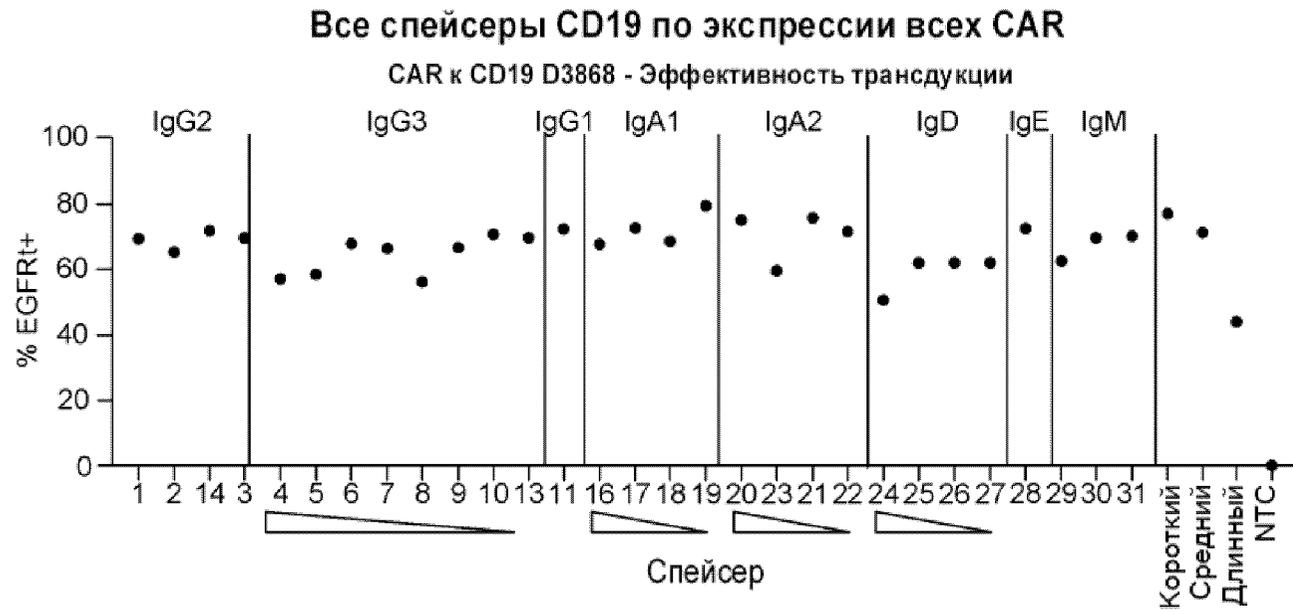
ФИГ. 12D

Лучшие спейсеры	Длина спейсера (Å)
Спейсер 1	50,4
Спейсер 11	75,6
Спейсер 13	45,8
Спейсер 14	57,6
Короткий	43,2

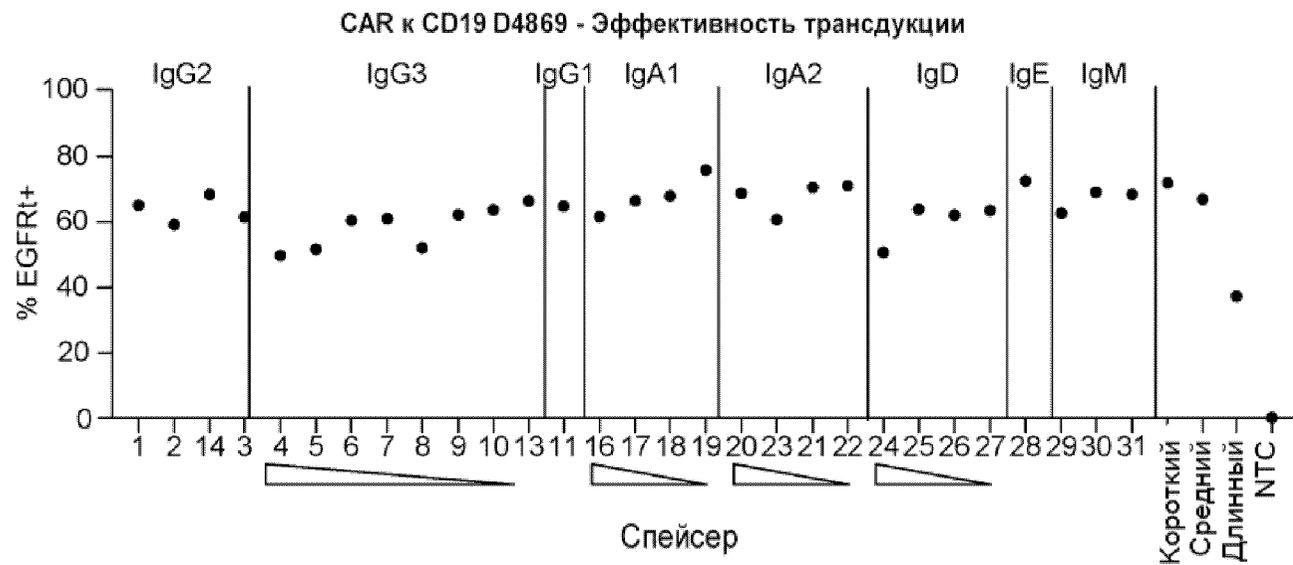
*Полный диапазон длин спейсеров- 43,2 Å ~ 248,4 Å

ФИГ. 12E

ФИГ. 13А

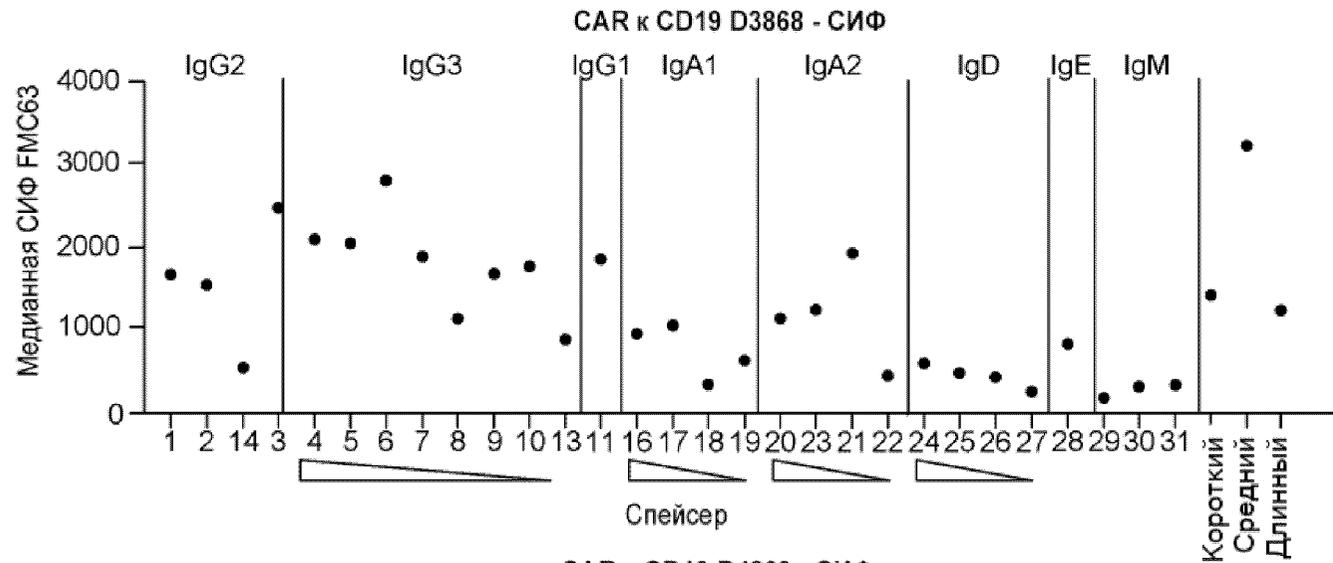


ФИГ. 13В

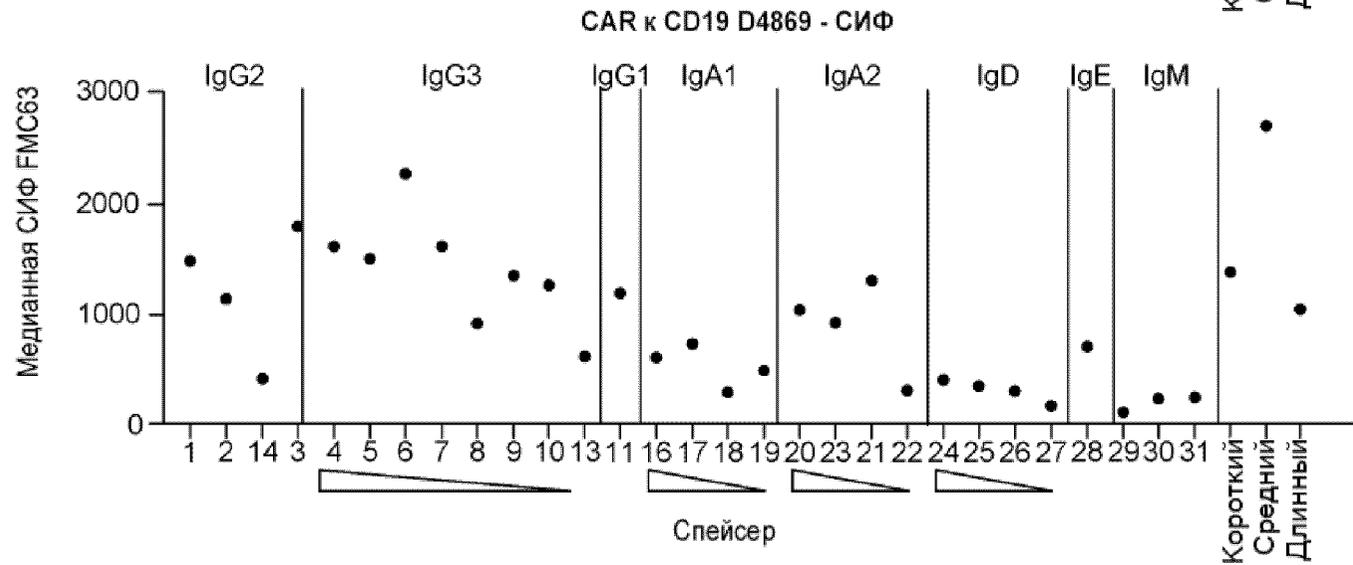


Все спейсеры CD19 по экспрессии всех CAR

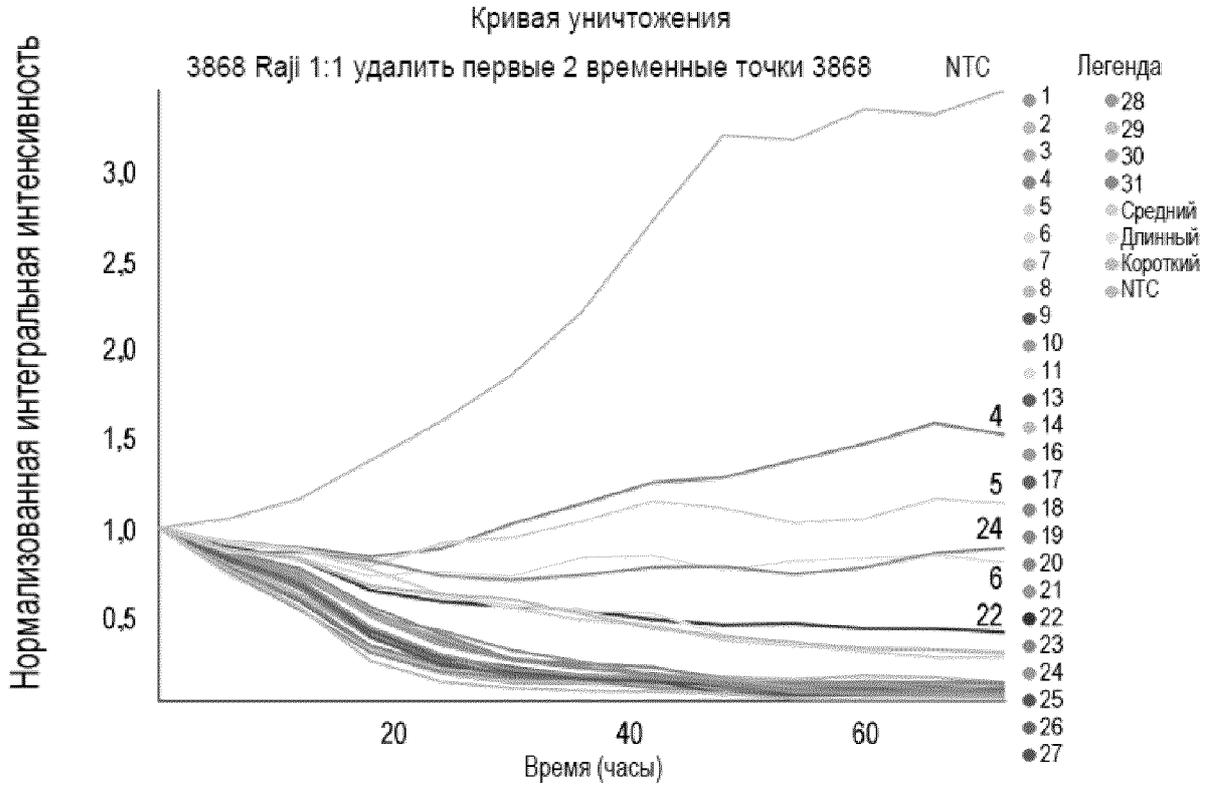
ФИГ. 13С



ФИГ. 13D



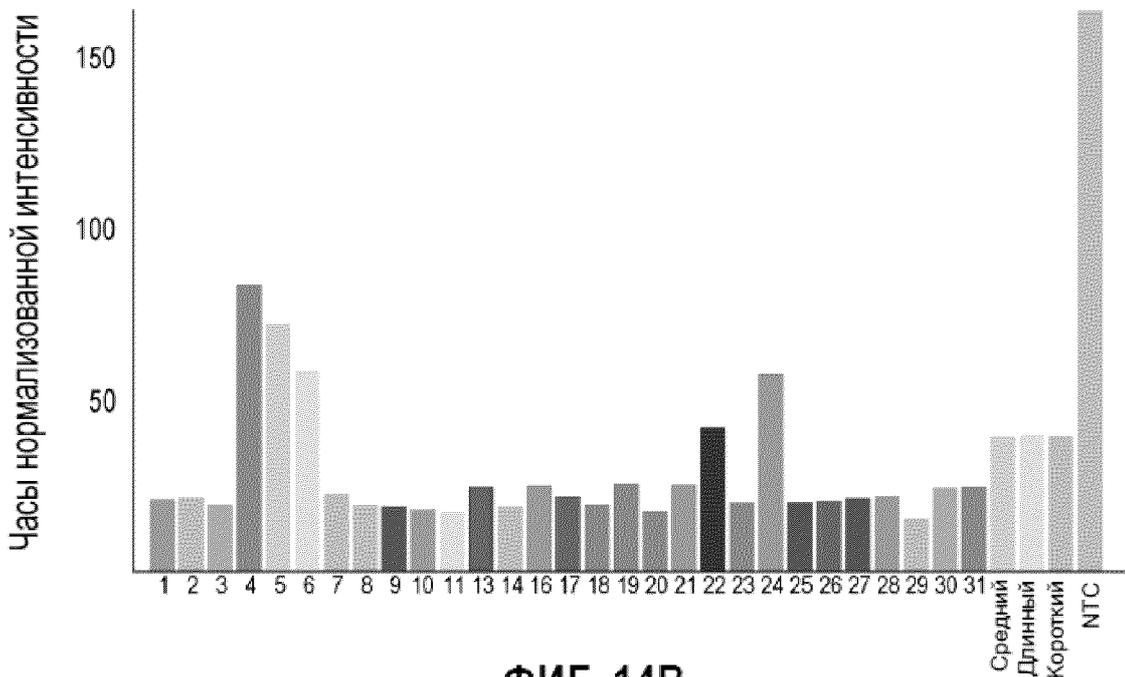
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D3868: Raji-NLR 1:1



ФИГ. 14А

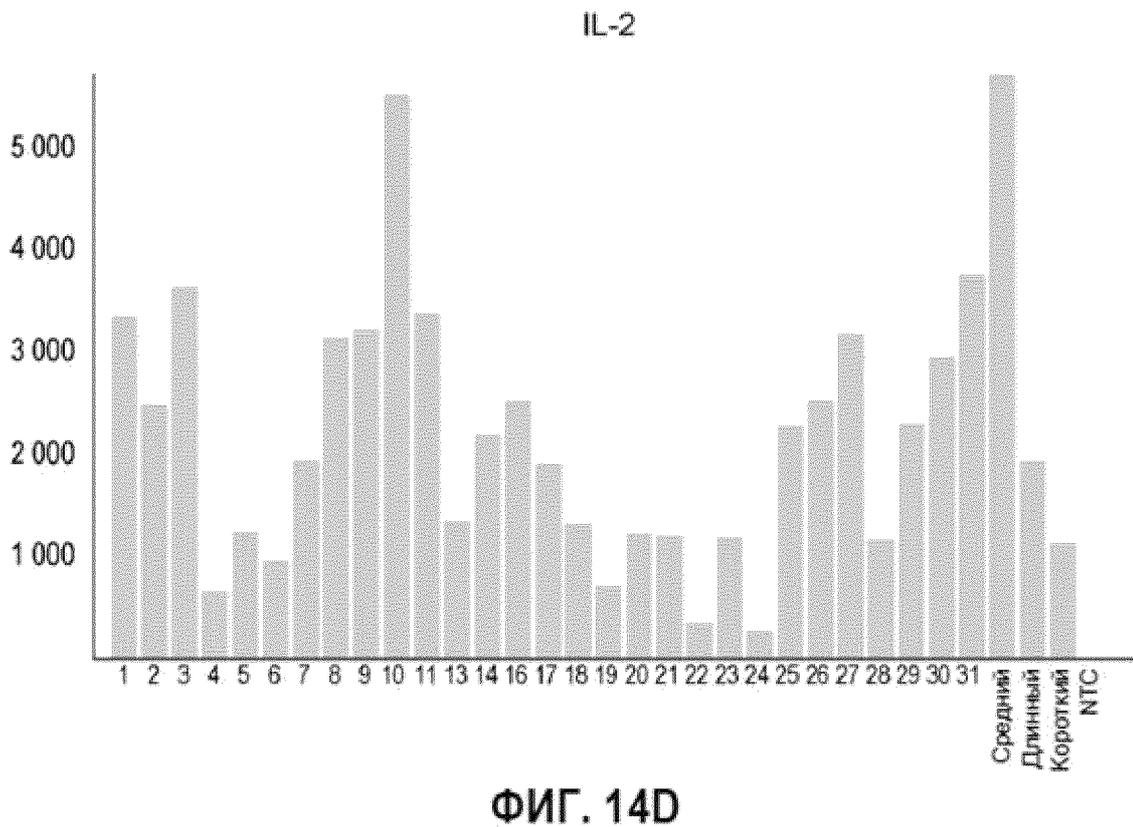
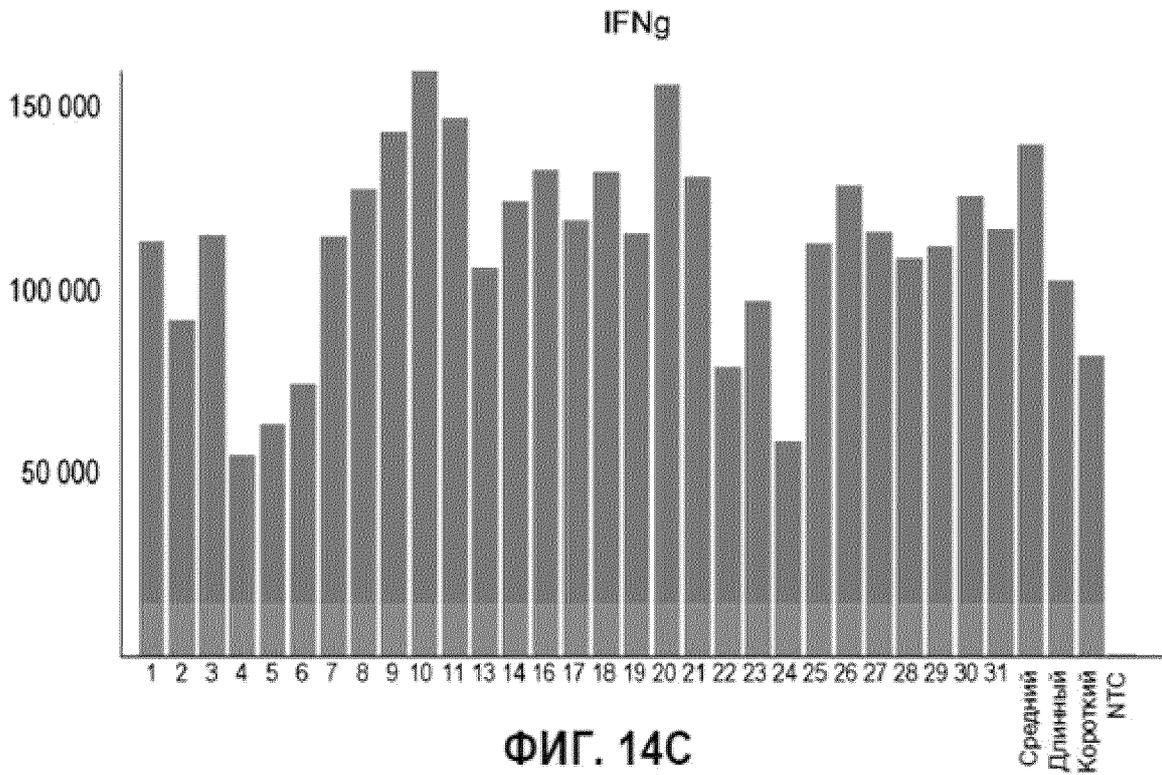
AUC

AUC: 3868 Raji 1:1 удалить первые 2 временные точки 3868



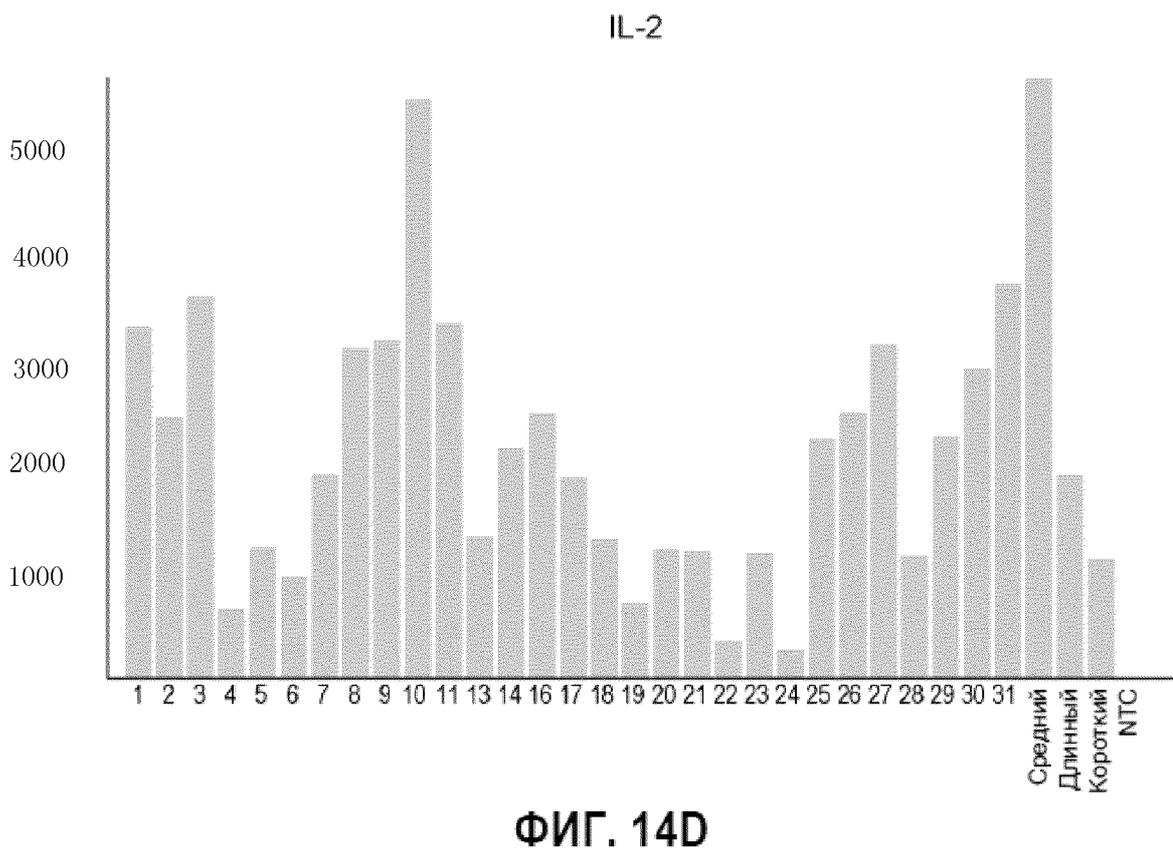
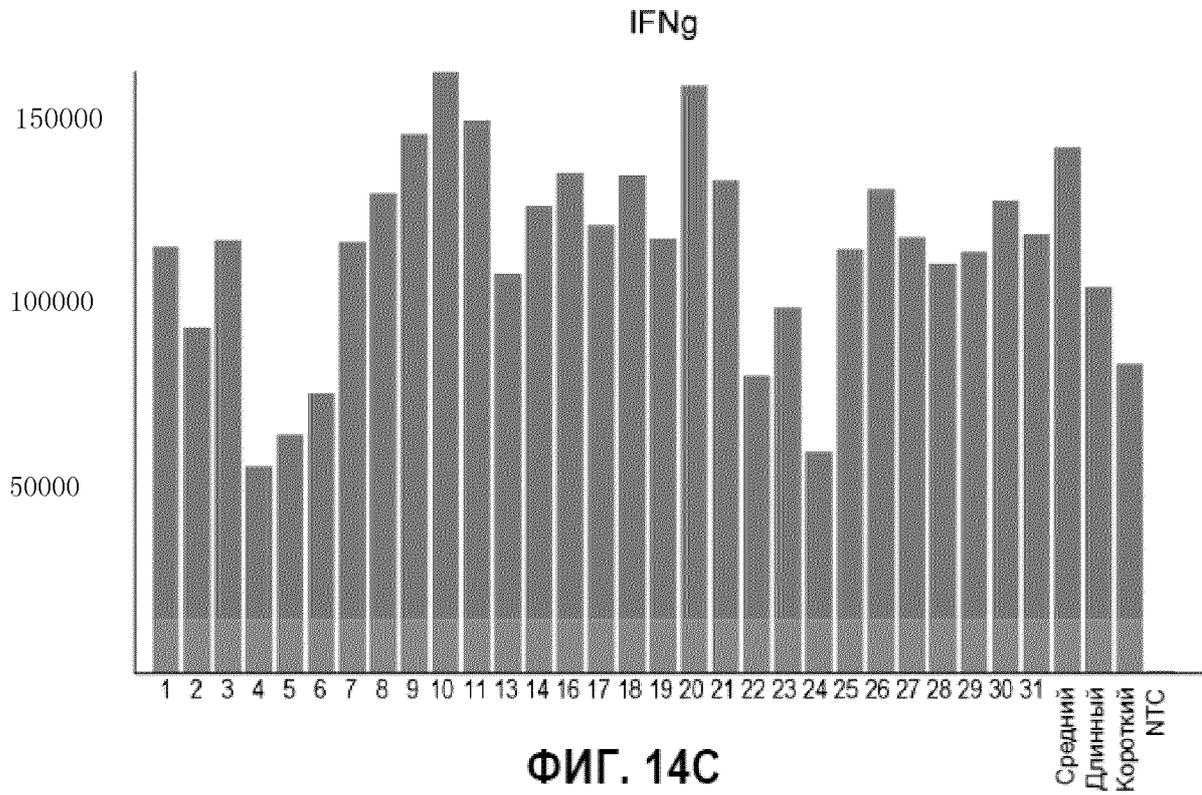
ФИГ. 14В

Первичное уничтожение и AUC CAR-T D3868: Raji-NLR 1:1

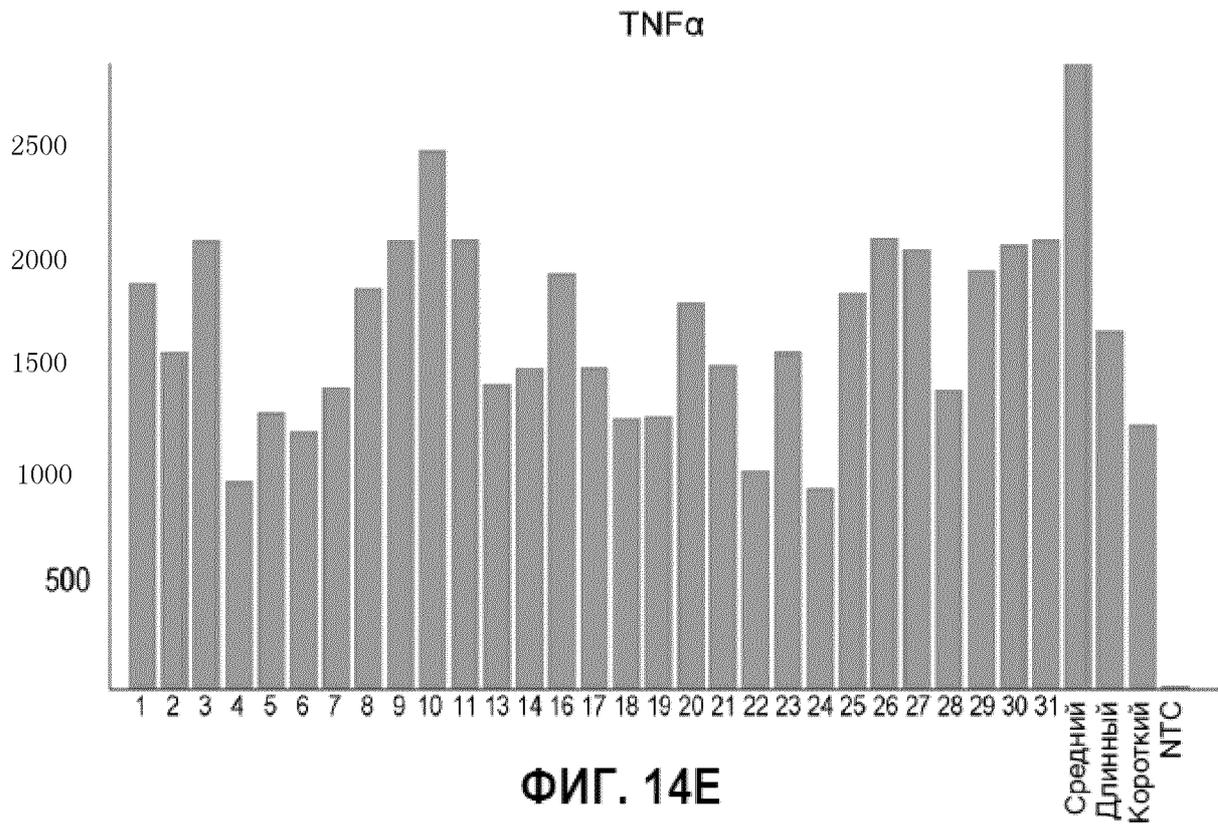


17/149

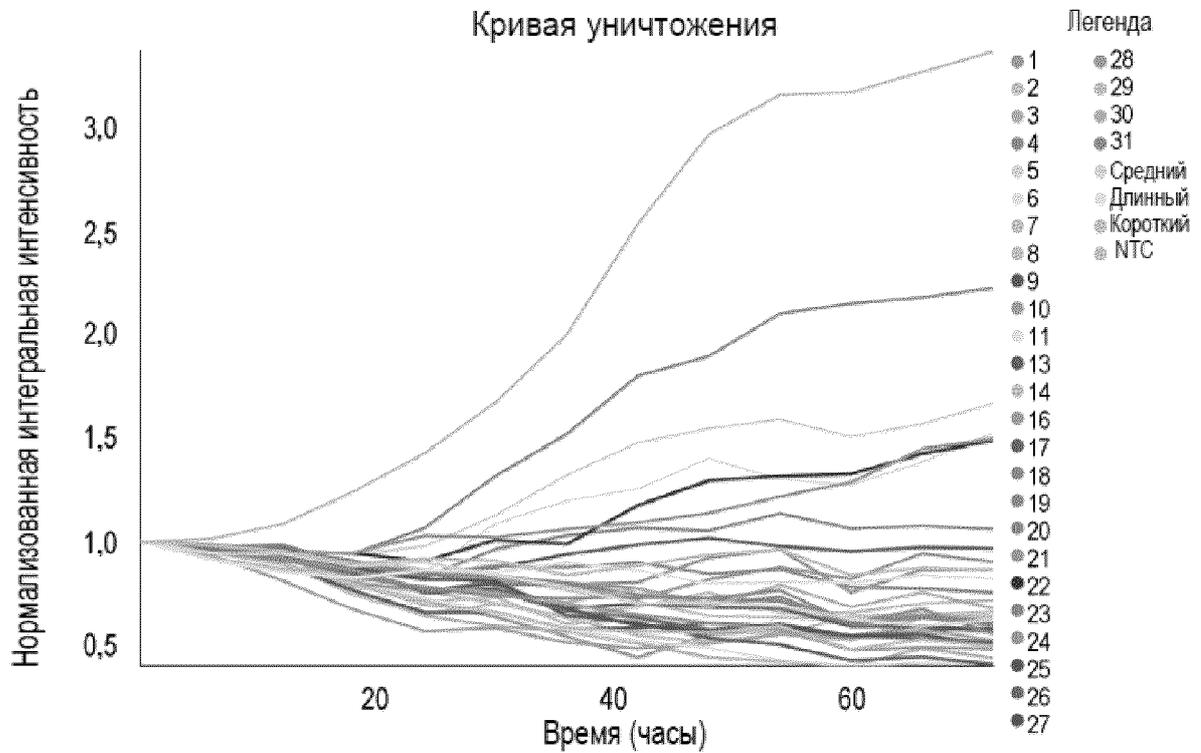
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D3868: Raji-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D3868: Raji-NLR 1:1

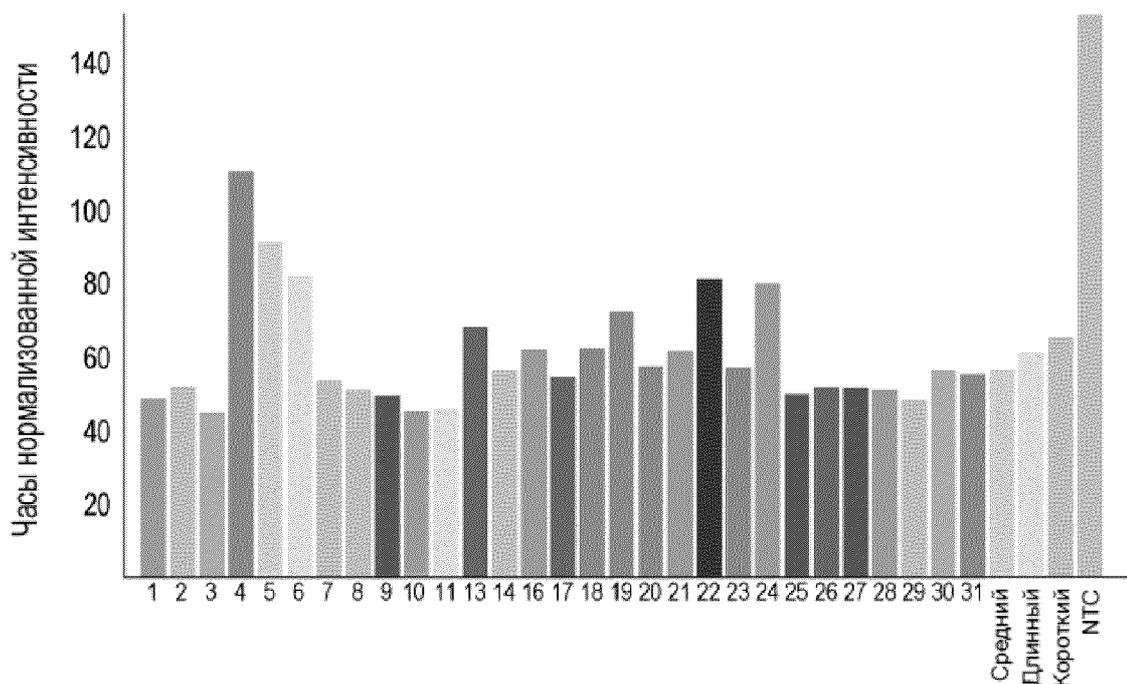


Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Raji-NLR 1:1



ФИГ. 15А

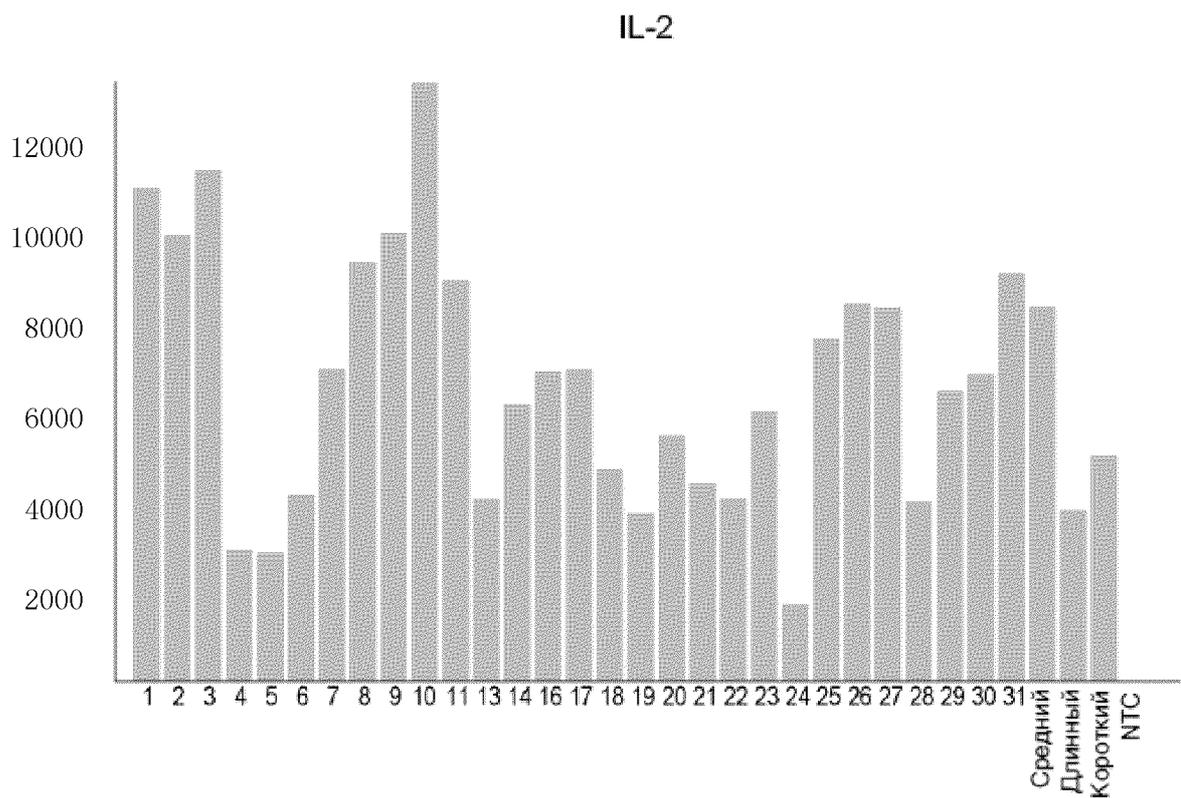
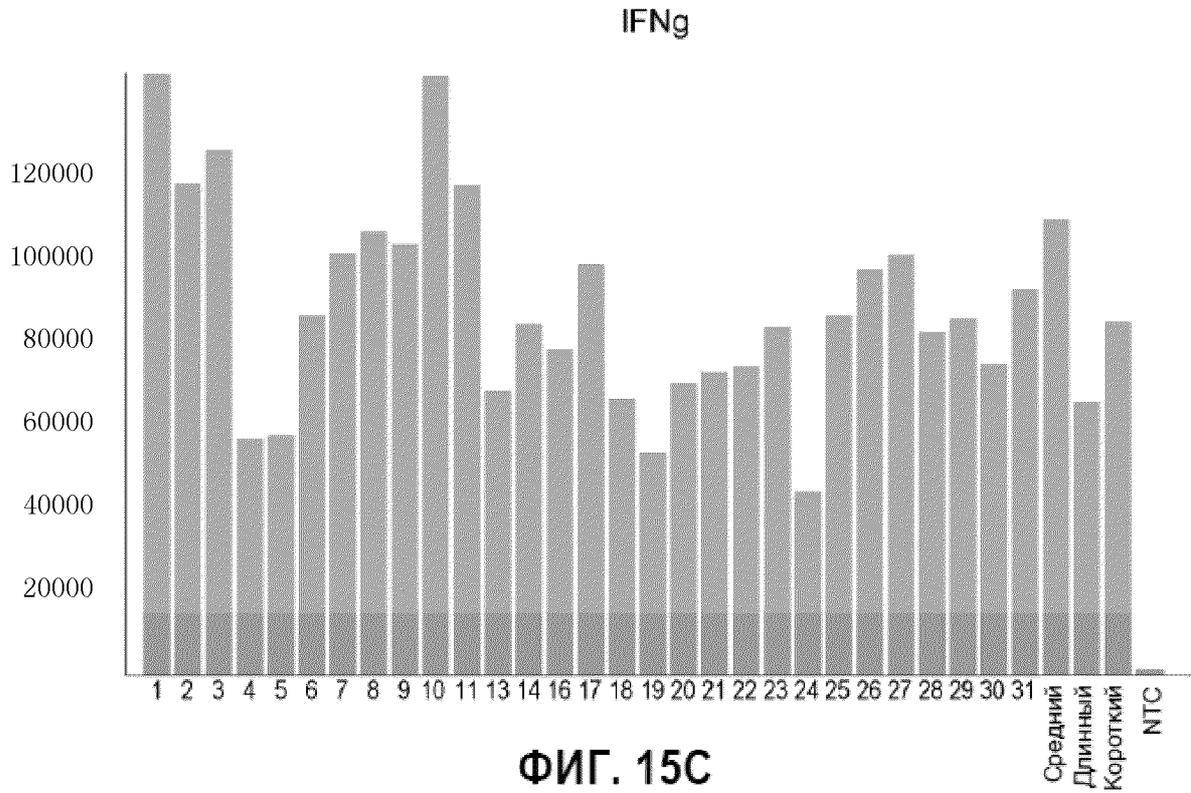
AUC



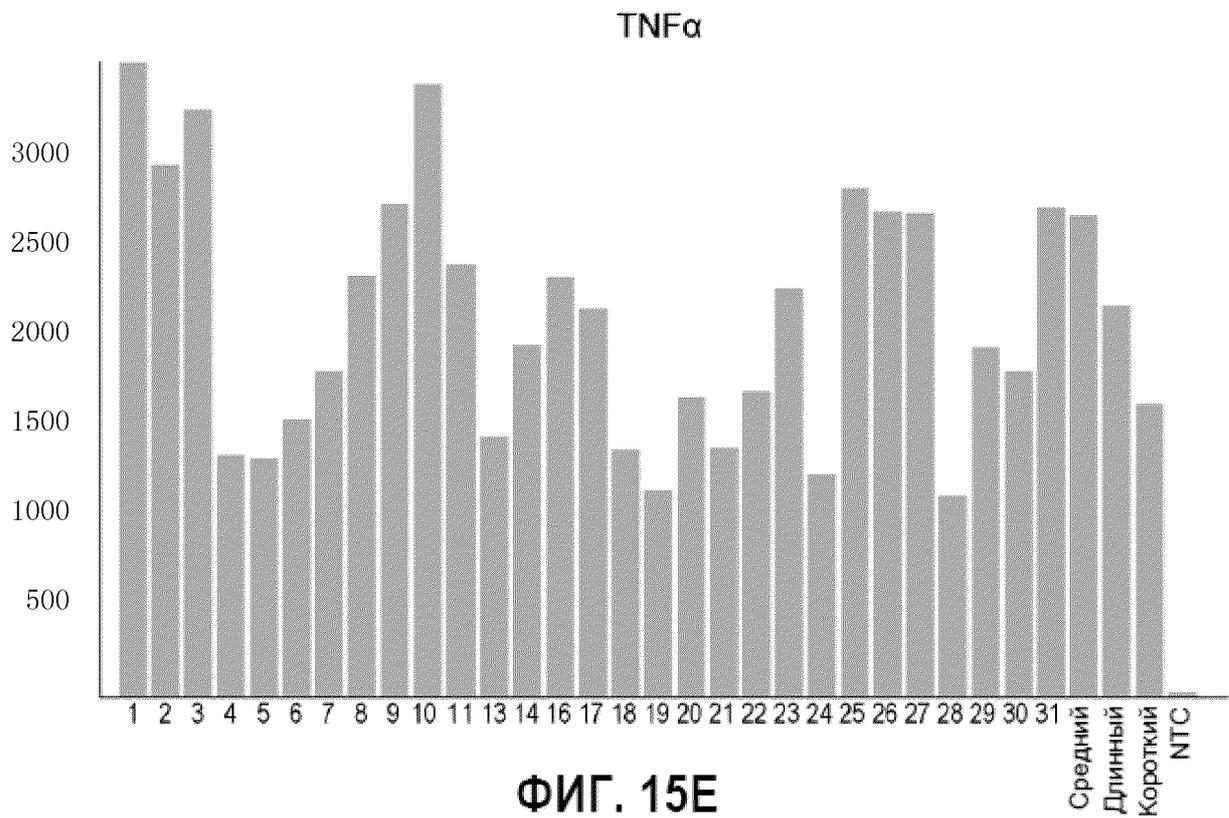
ФИГ. 15В

20/149

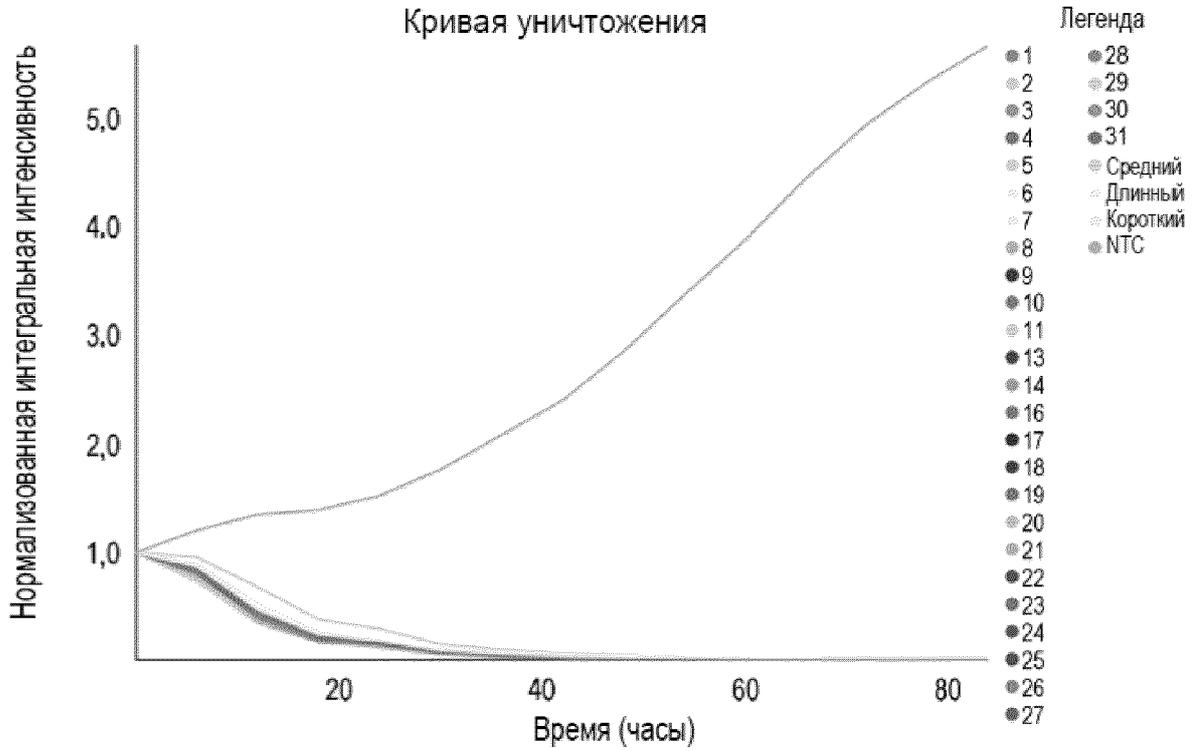
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Raji-NLR 1:1



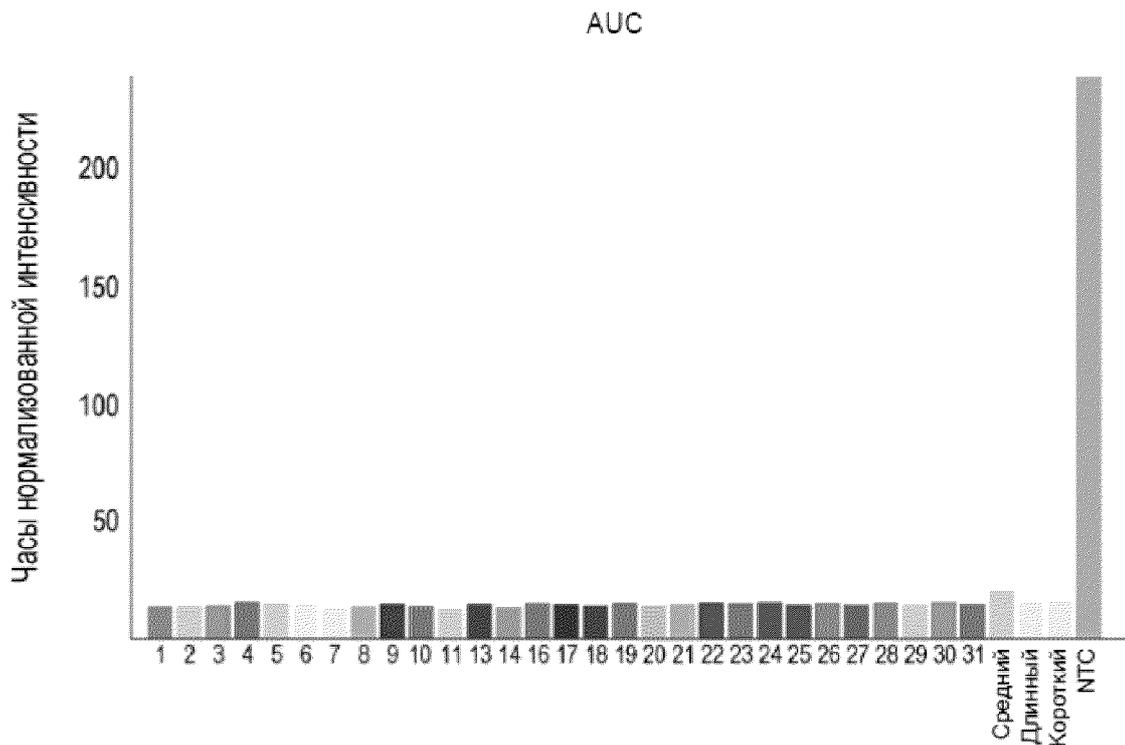
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Raji-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D3868: Nalm6-NLR 1:1

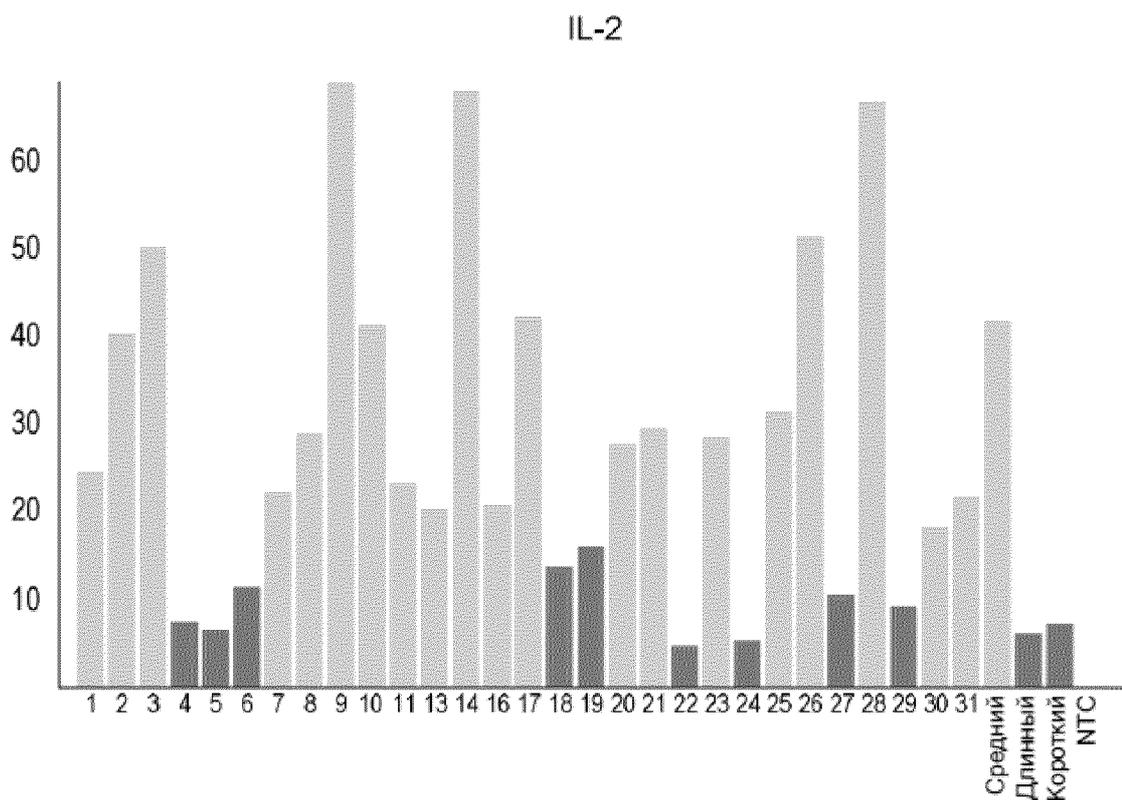
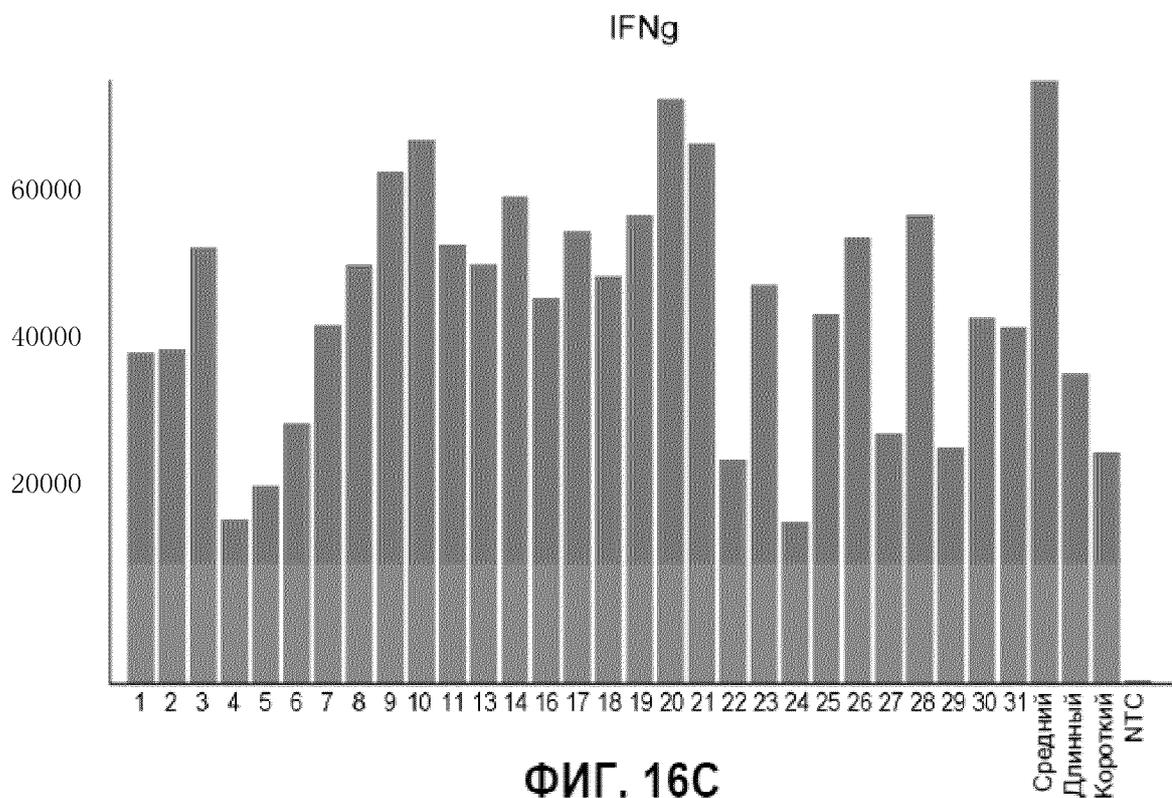


ФИГ. 16А

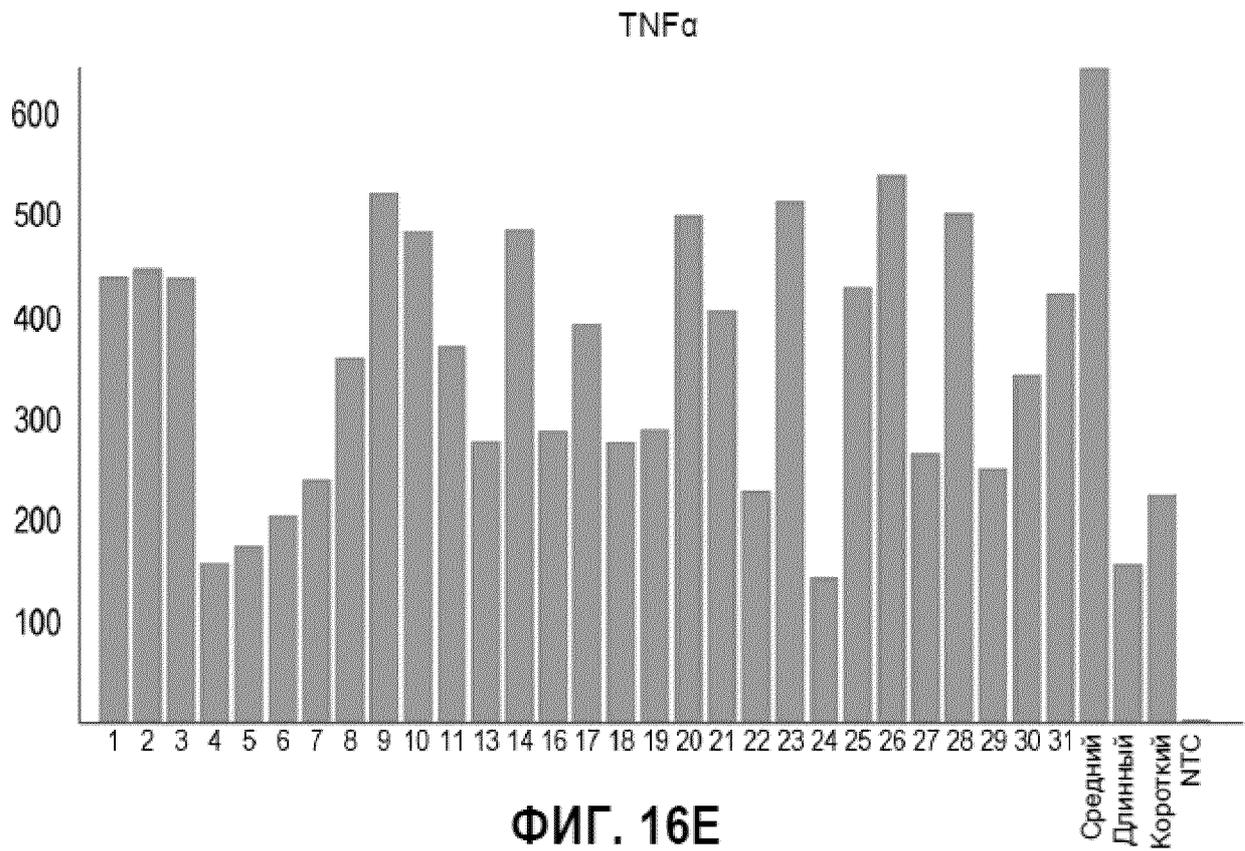


ФИГ. 16В

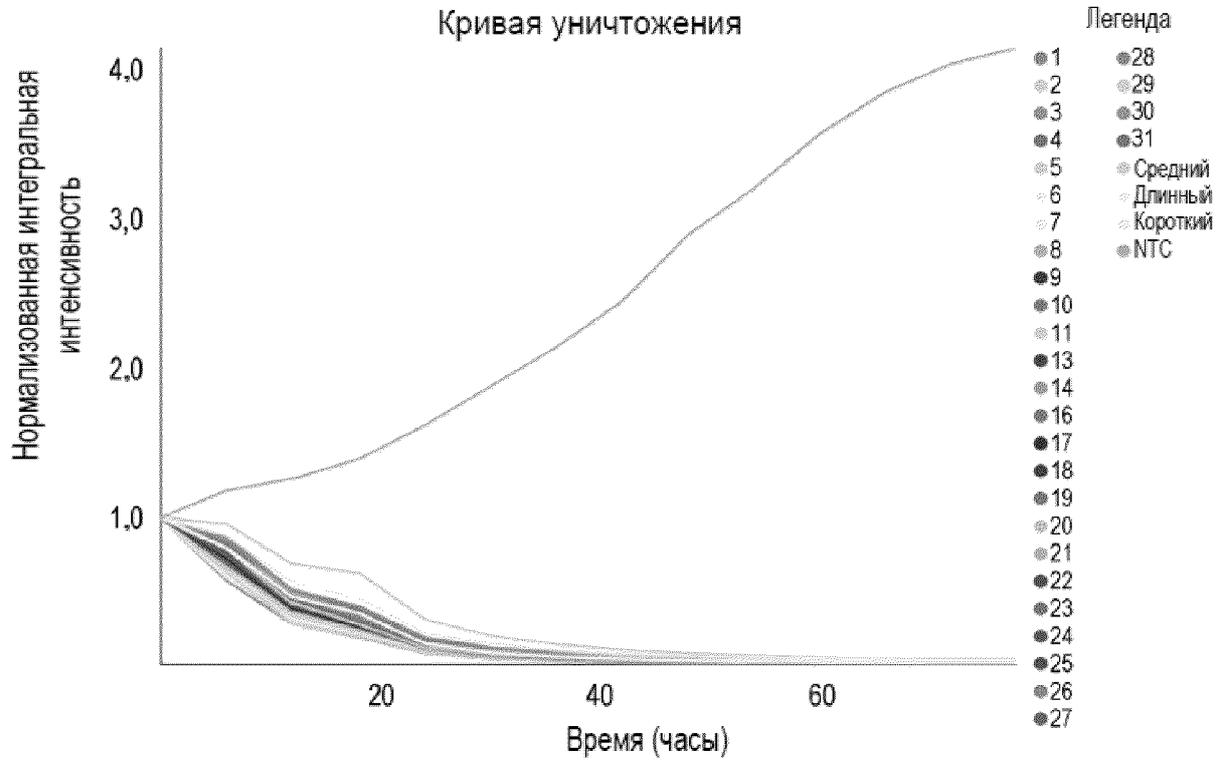
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D3868: Nalm6-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D3868: Nalm6-NLR 1:1

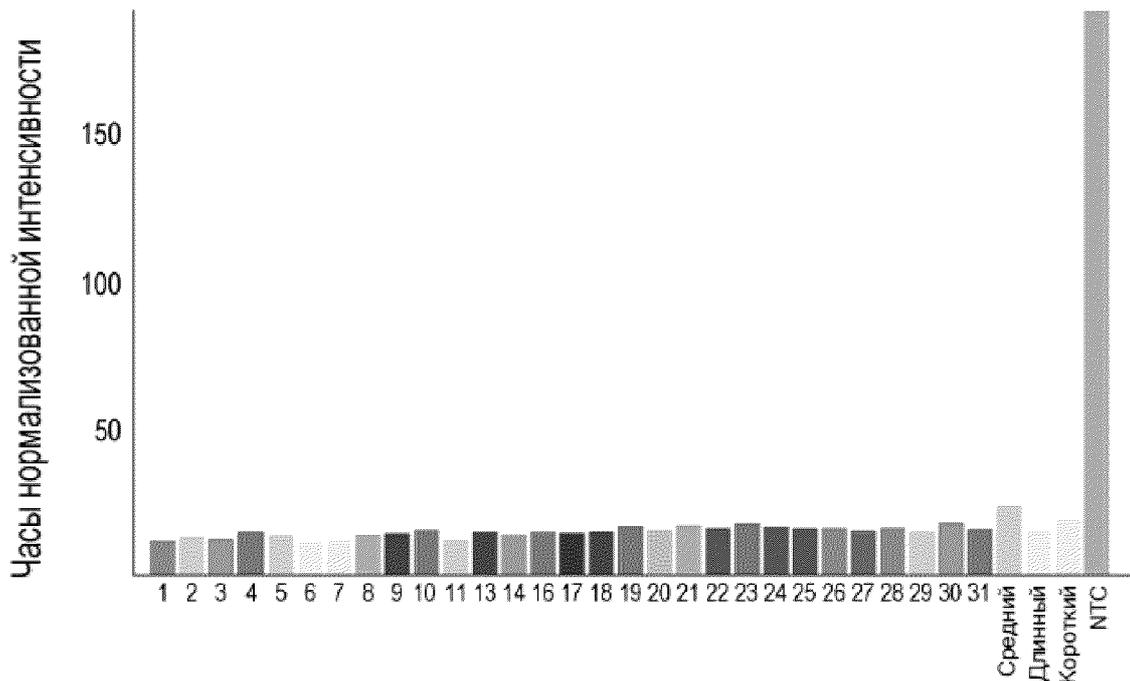


Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Nalm6-NLR 1:1



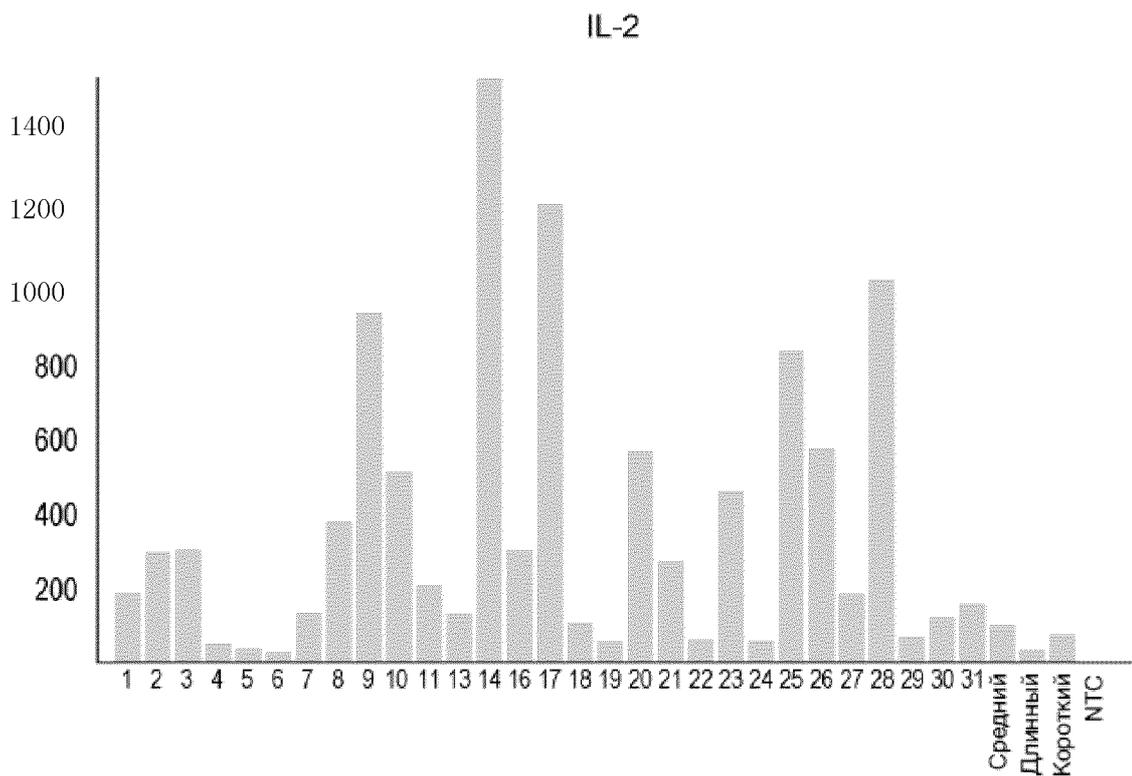
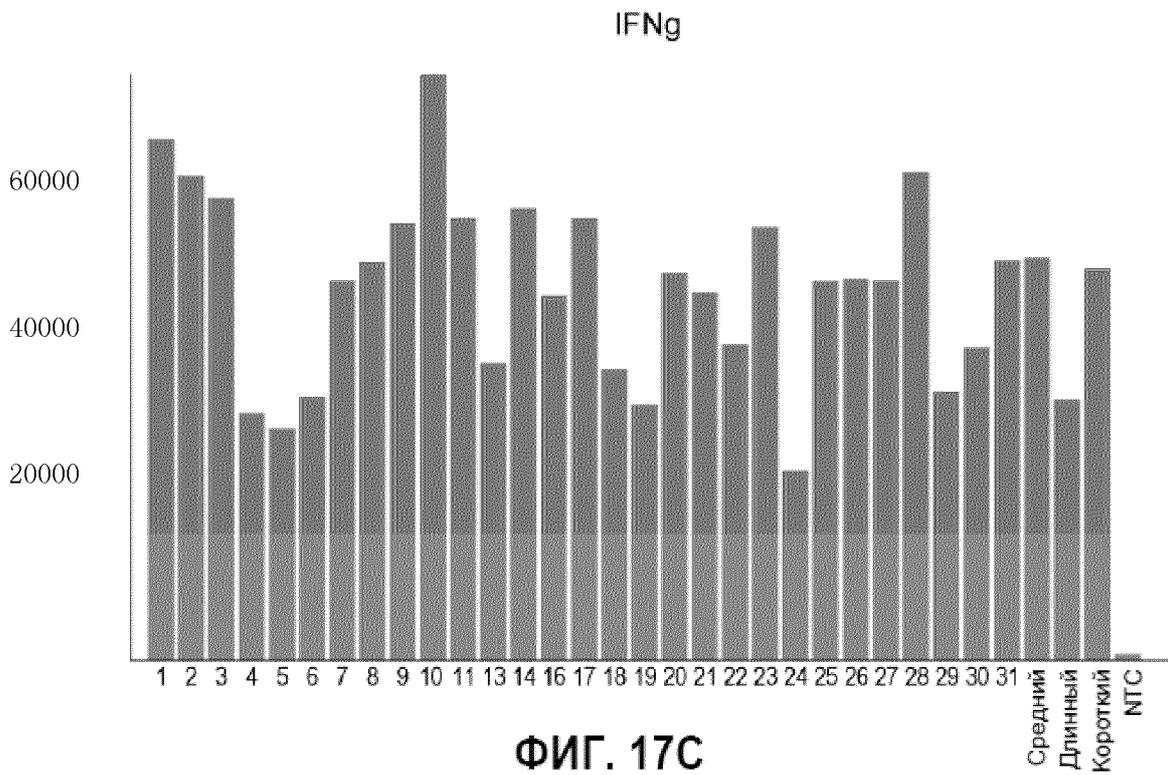
ФИГ. 17А

AUC

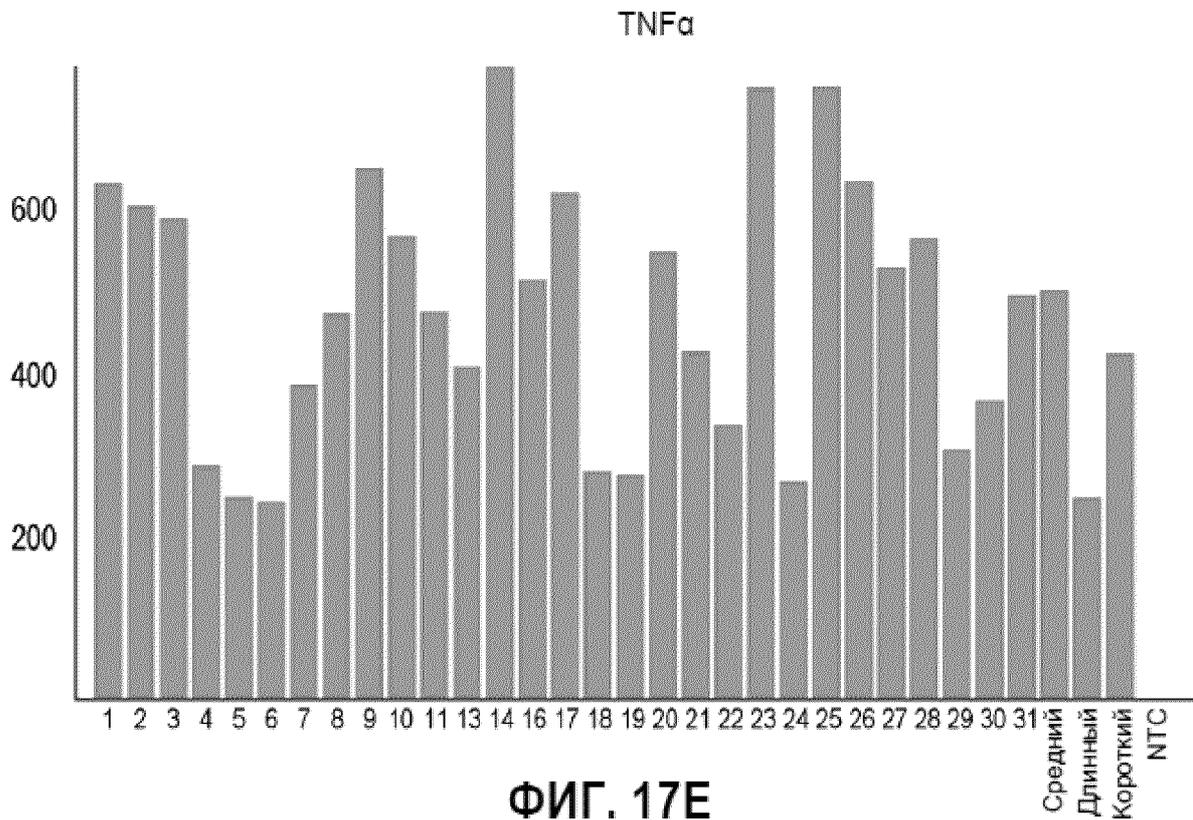


ФИГ. 17В

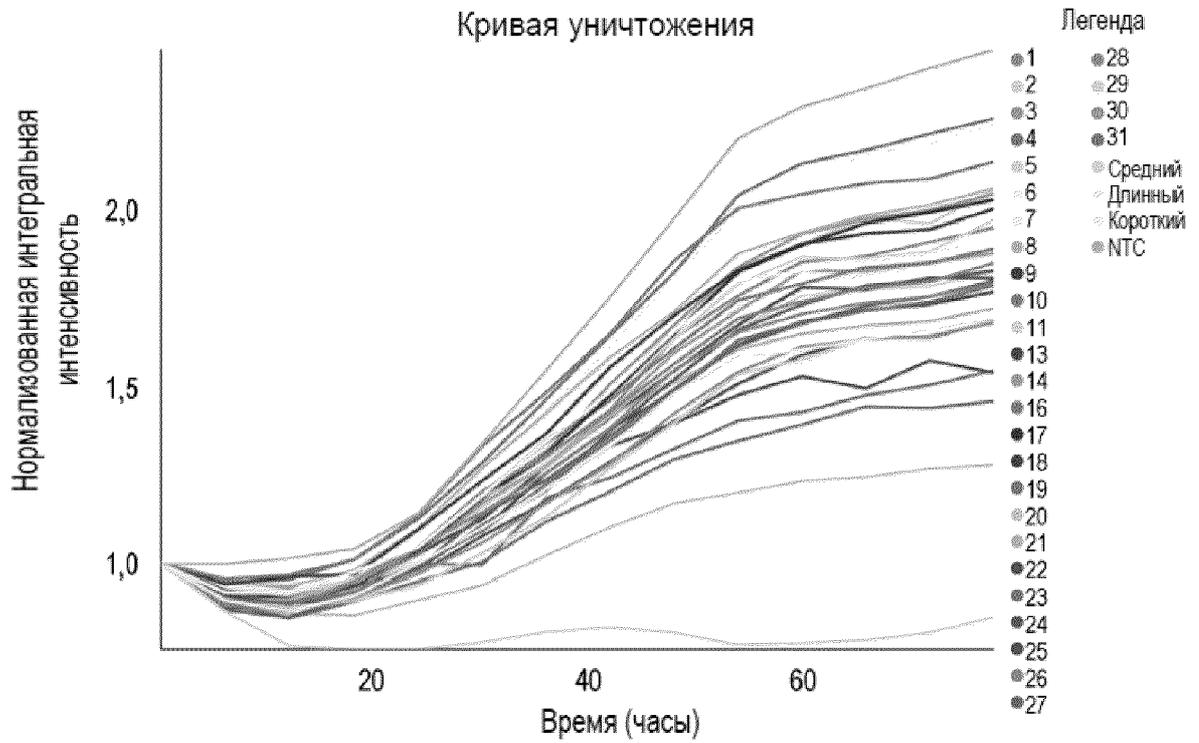
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Nalm6-NLR 1:1



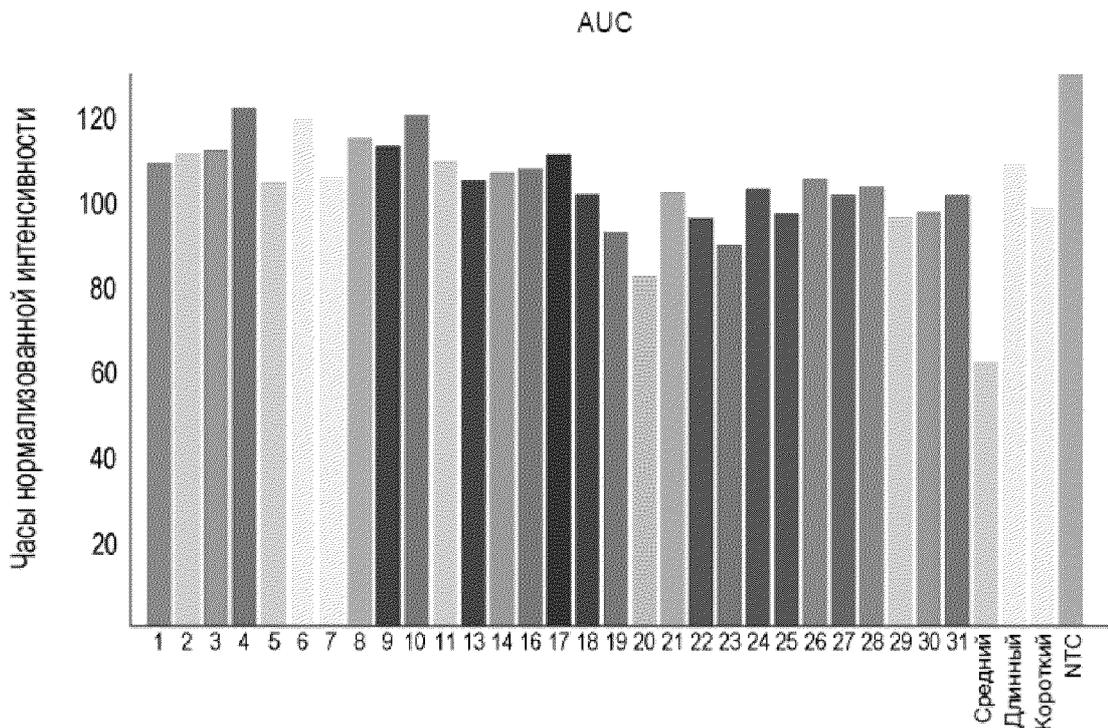
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Nalm6-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D3868: Raji_CD19_KO-NLR 1:1



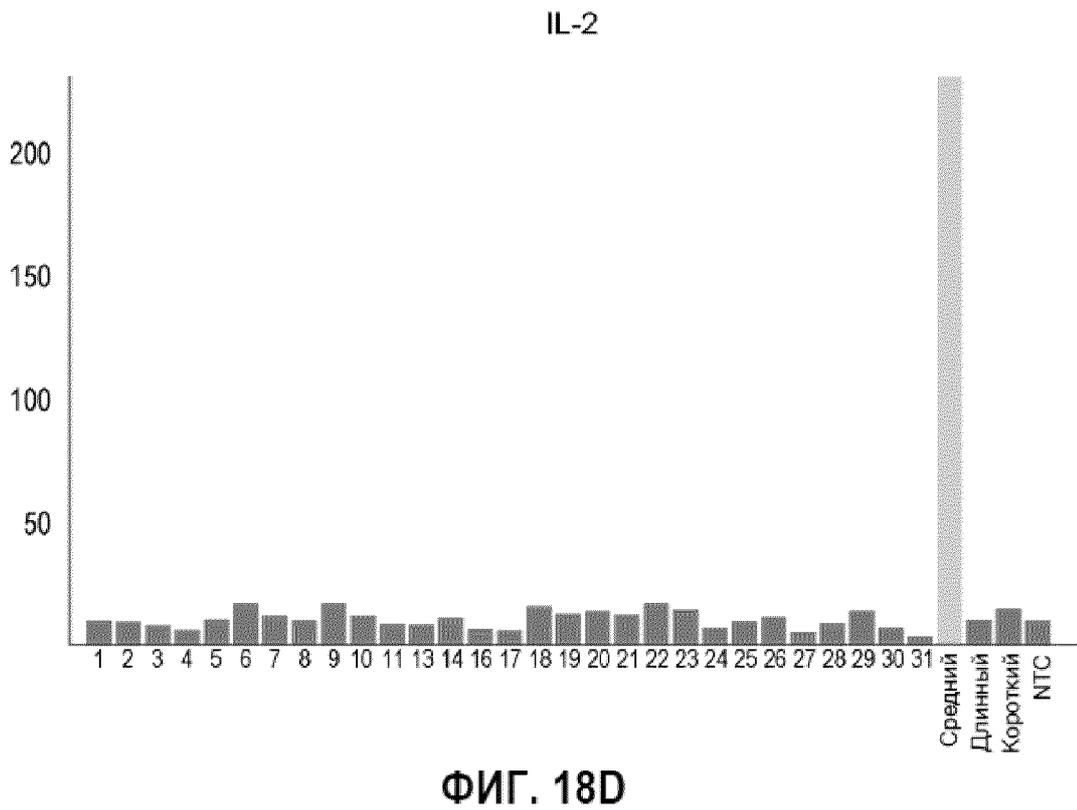
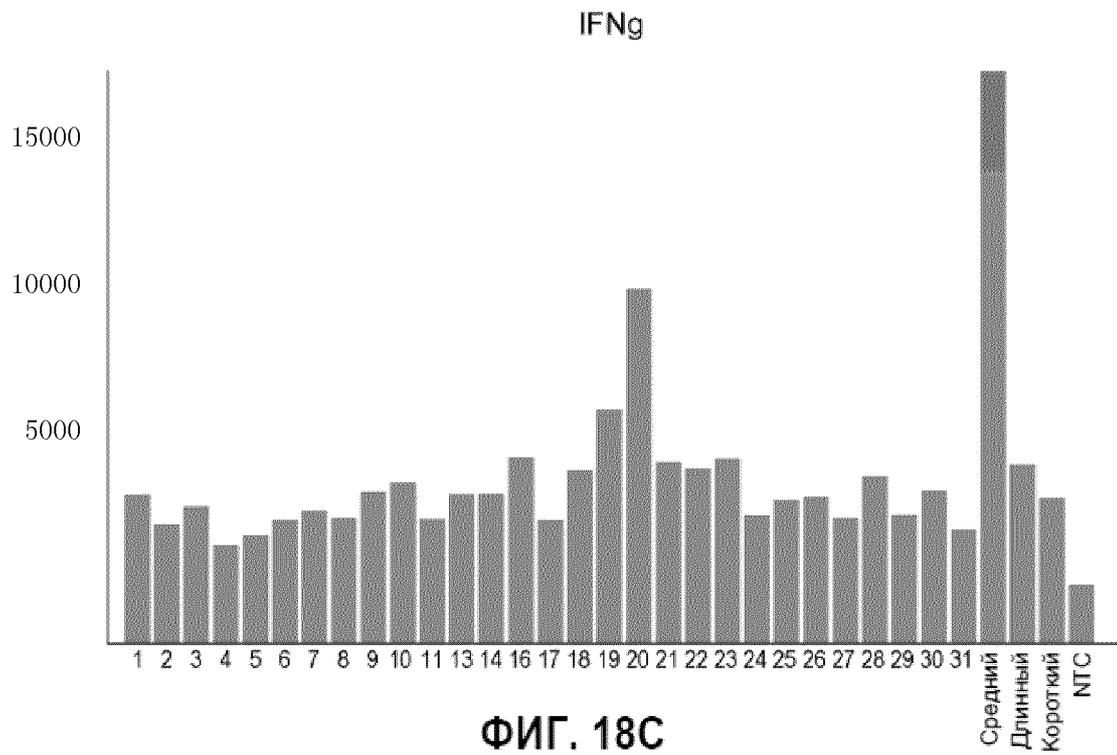
ФИГ. 18А



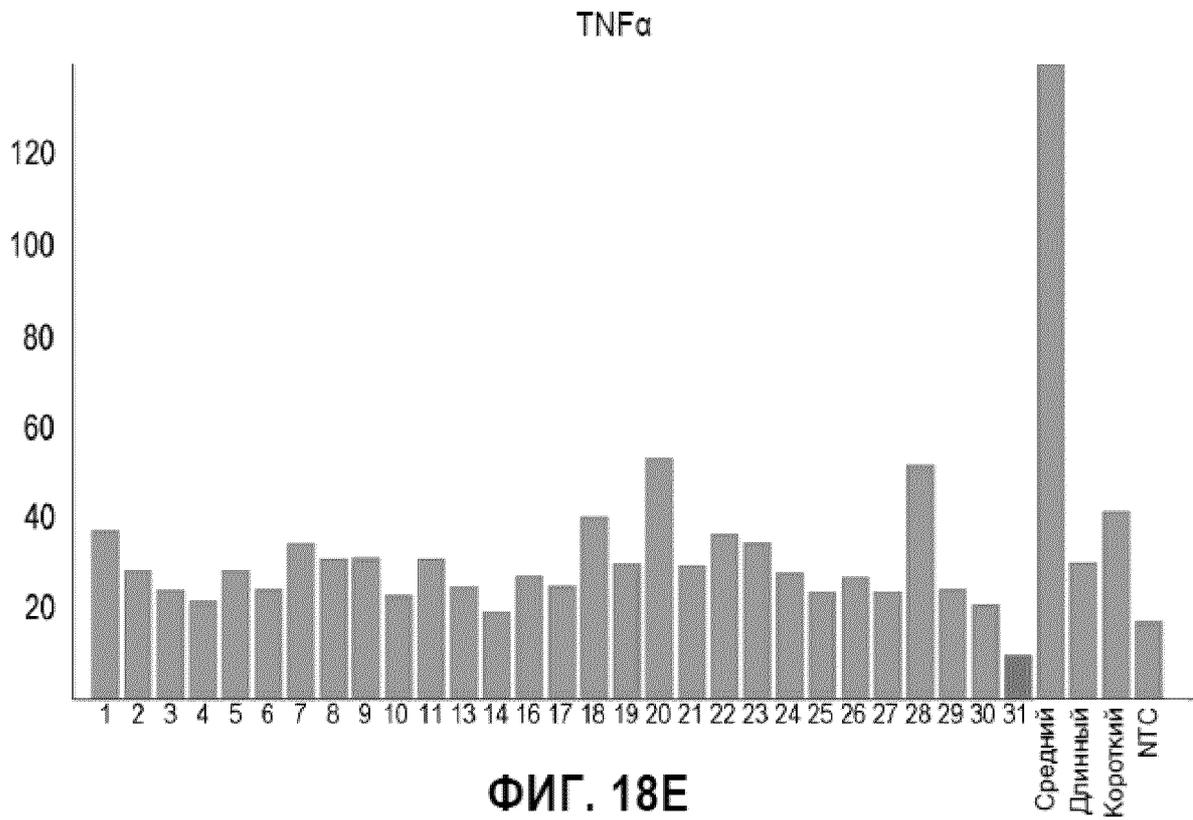
ФИГ. 18В

29/149

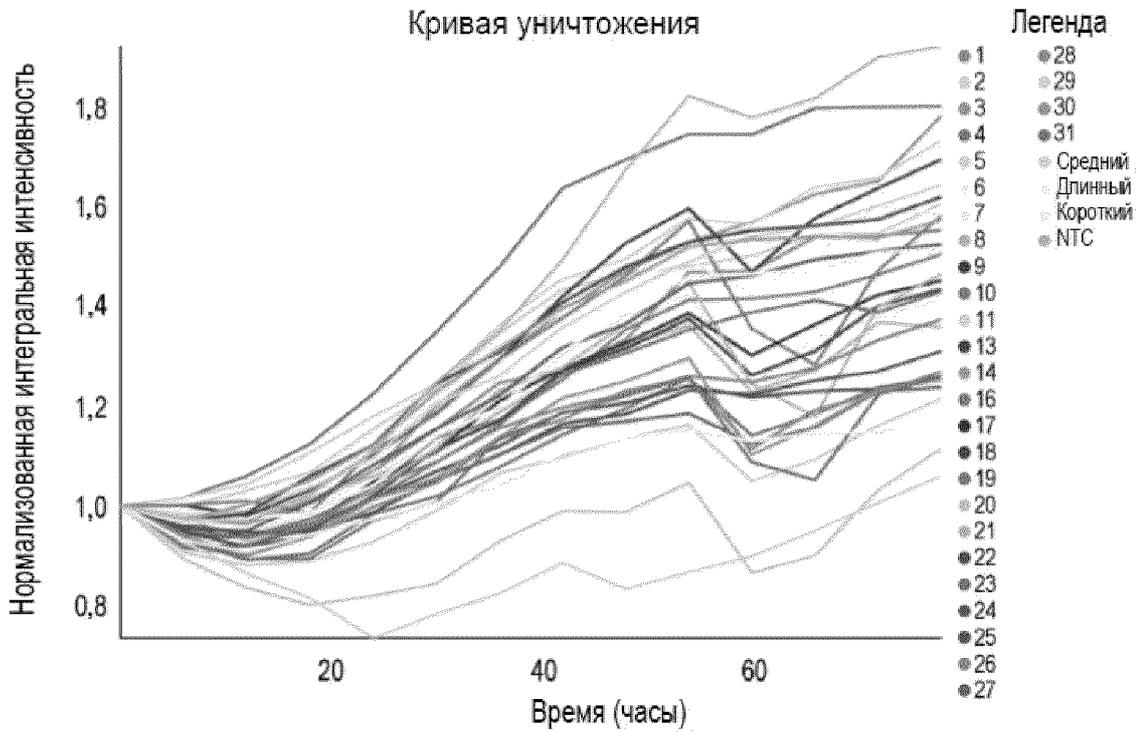
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D3868: Raji_CD19_KO-NLR 1:1



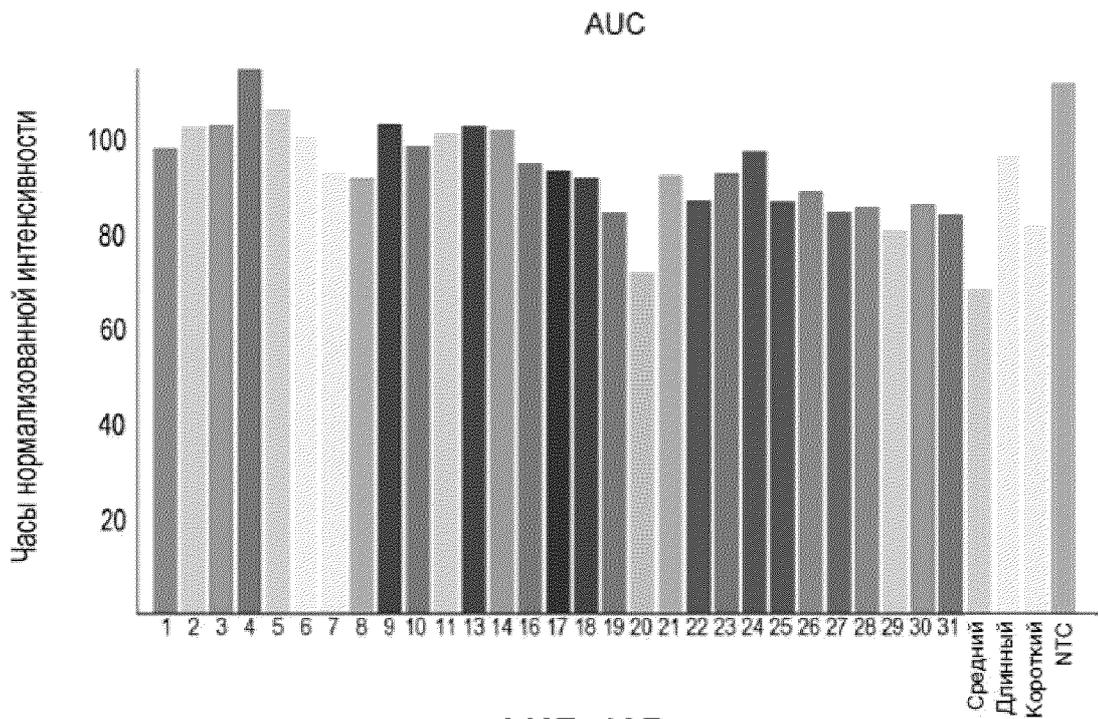
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Nalm6-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Raji_CD19_KO-NLR 1:1

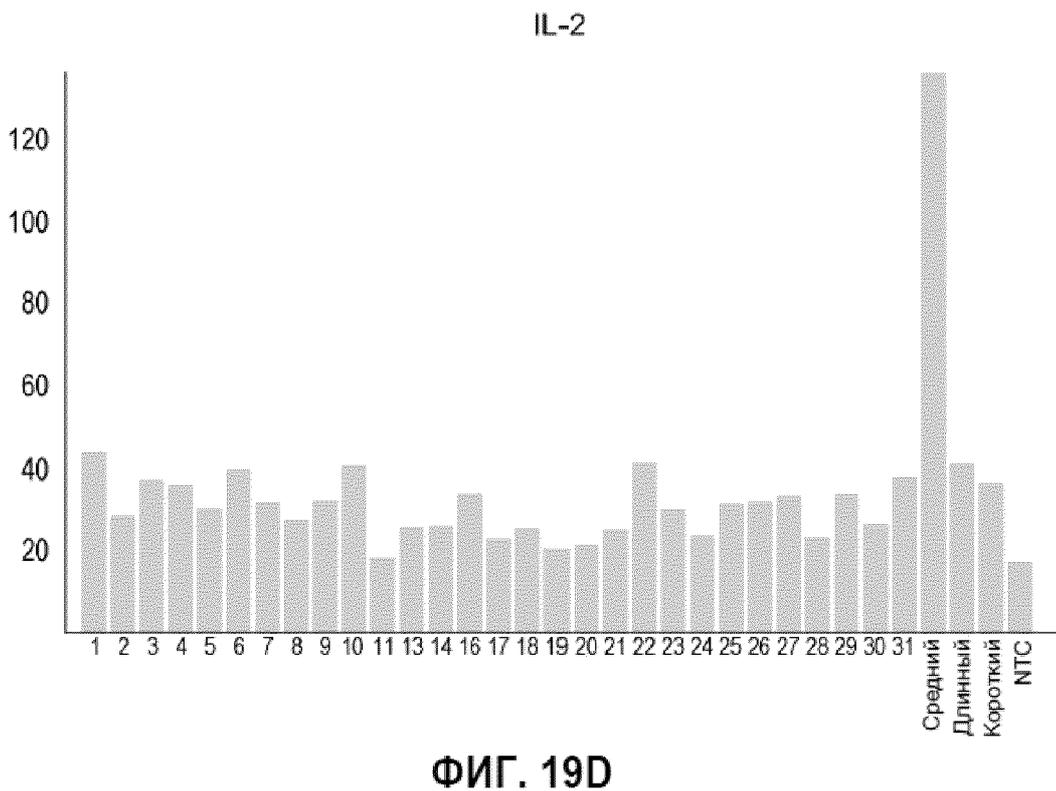
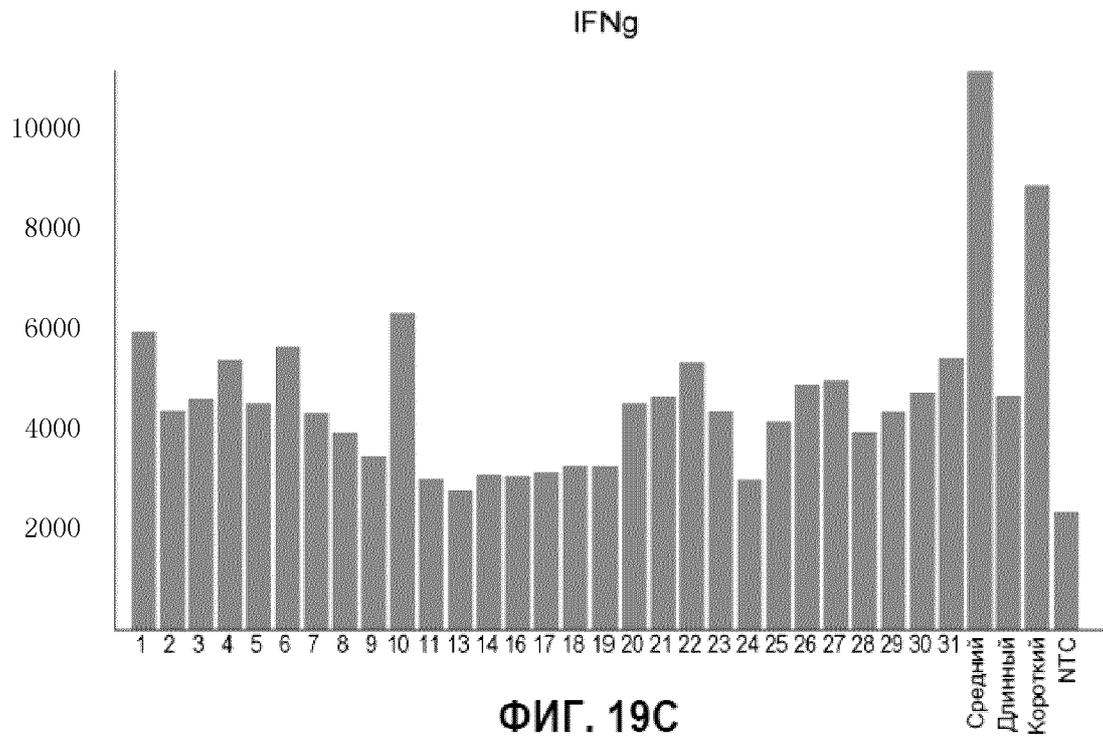


ФИГ. 19А

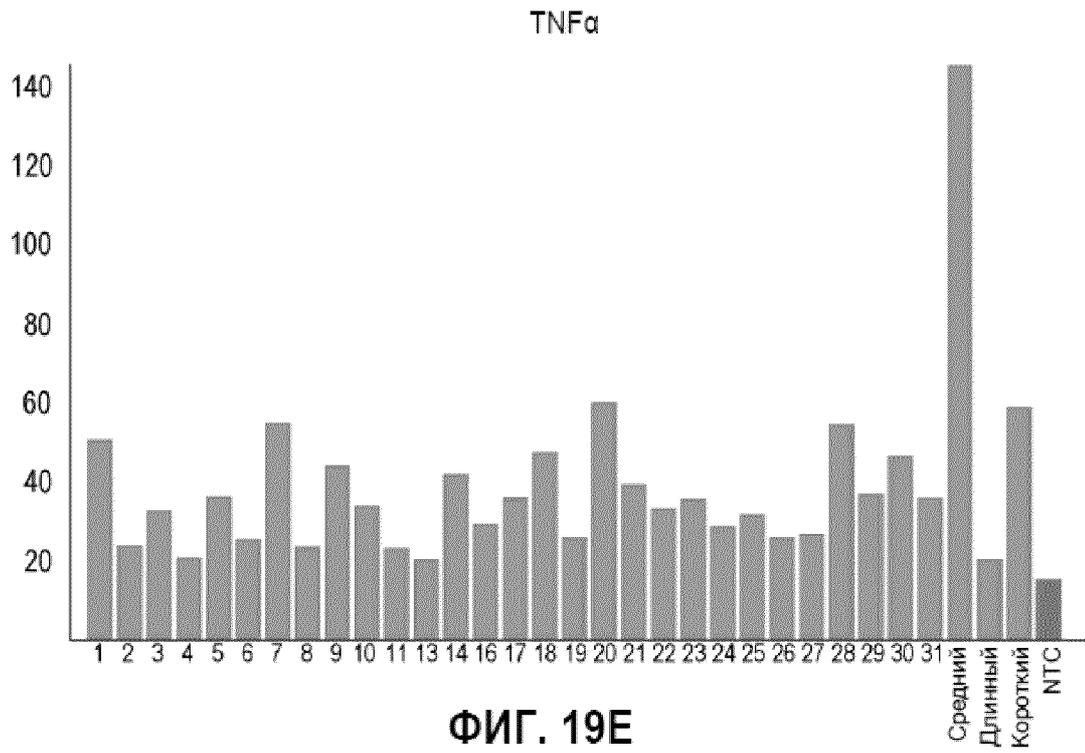


ФИГ. 19В

Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Raji_CD19_KO-NLR 1:1

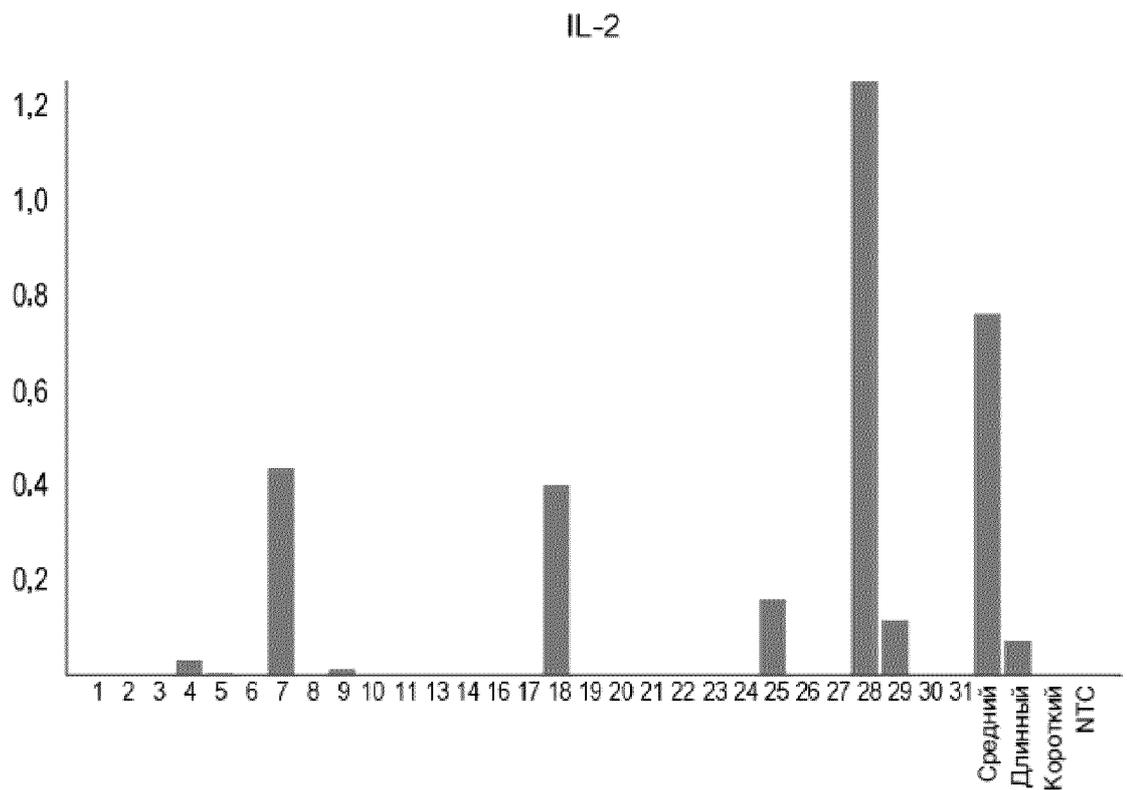
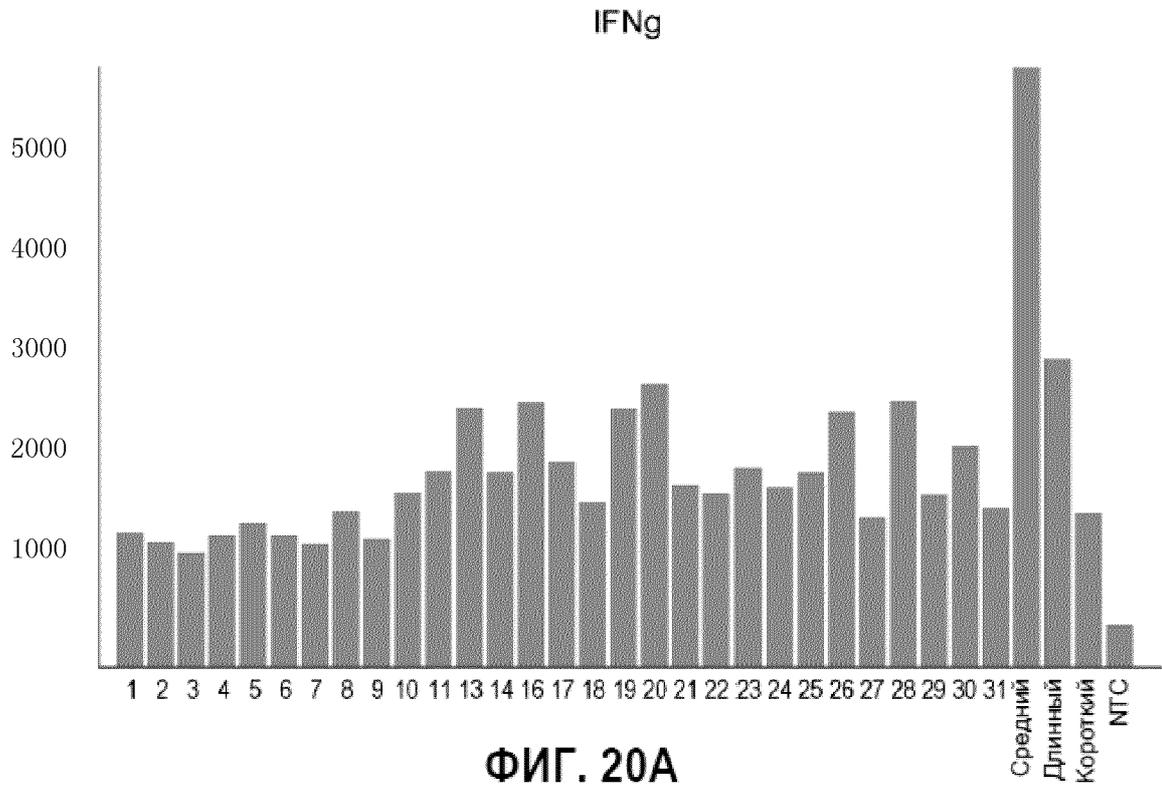


Первичное уничтожение и AUC CAR-T D4869: Raji_CD19_KO-NLR 1:1

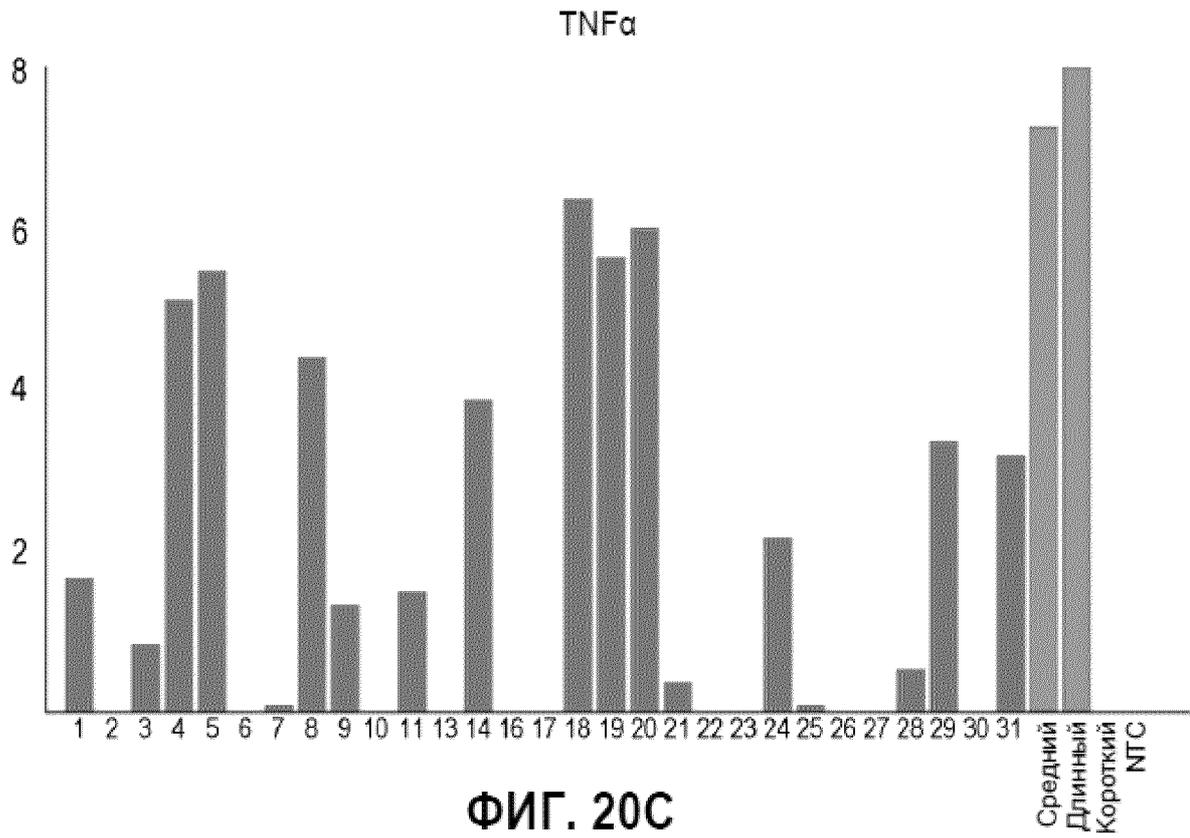


34/149

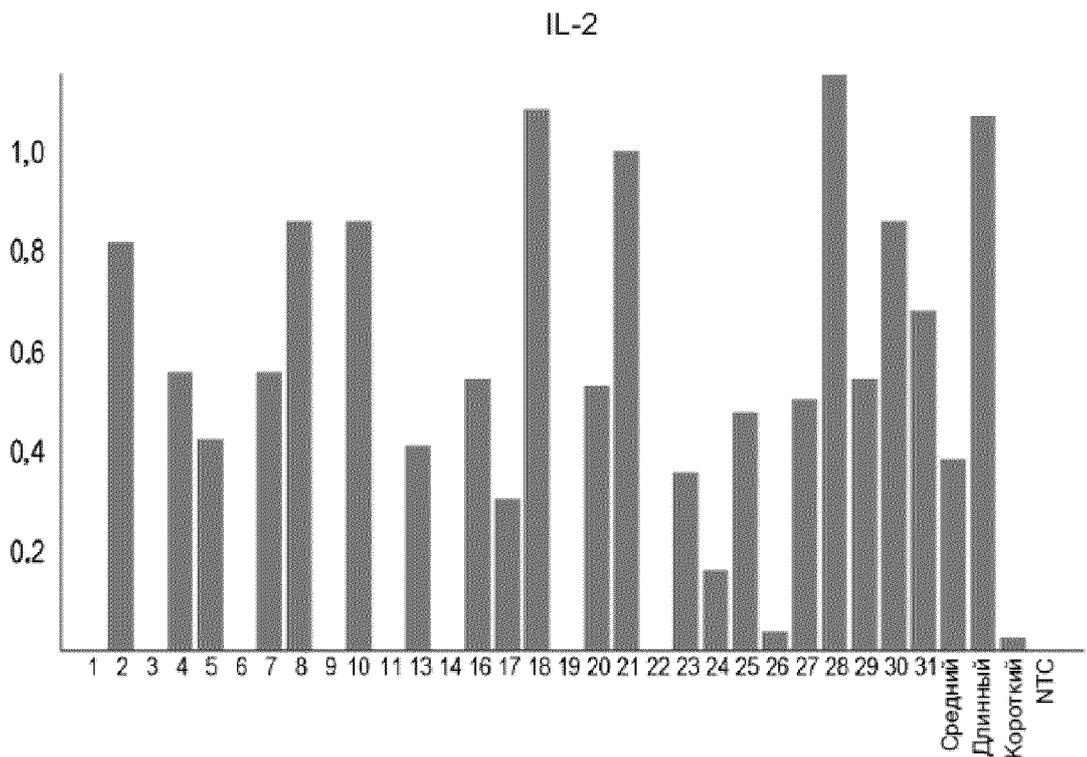
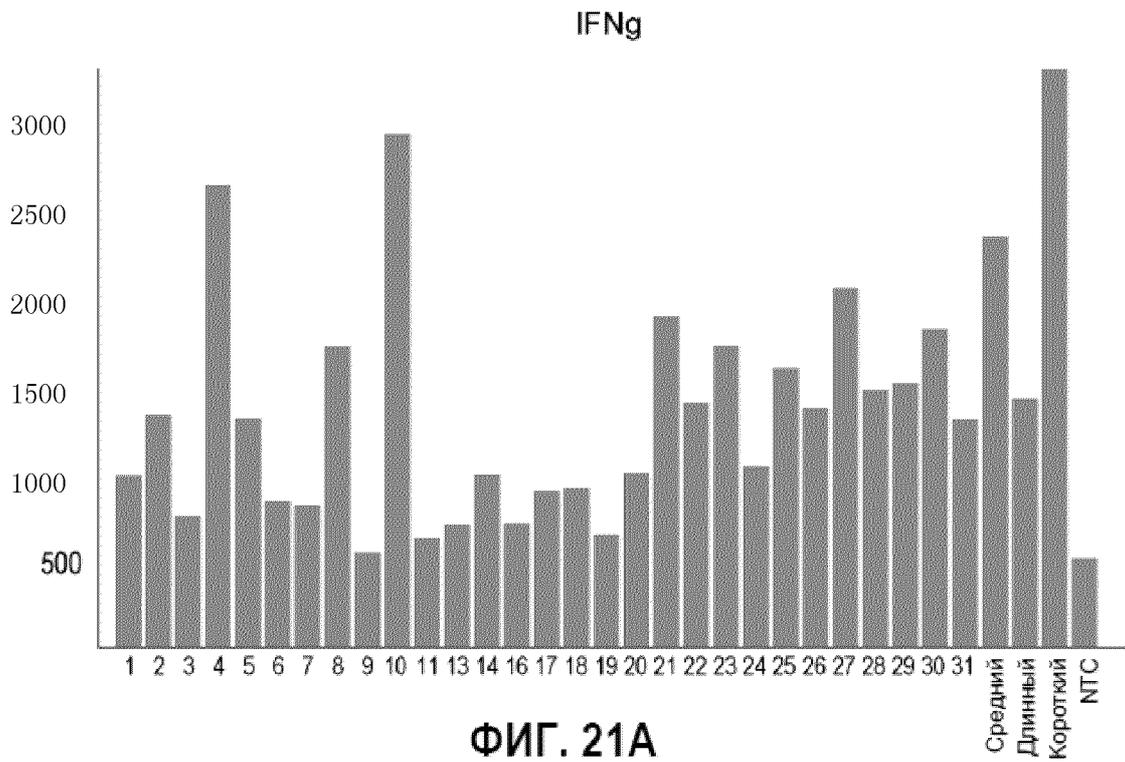
Независимые от мишени цитокины D3868



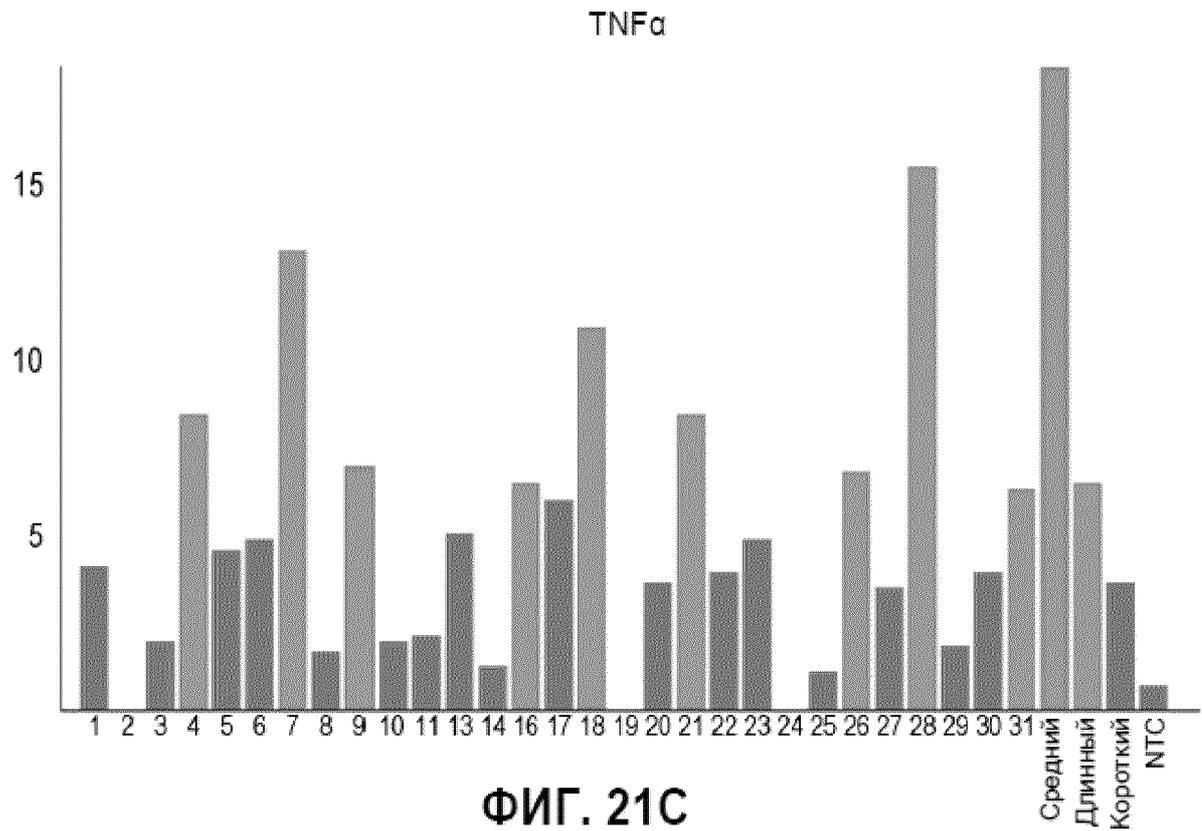
Независимые от мишени цитокины D3868



Зависимые от мишени цитокины D4869



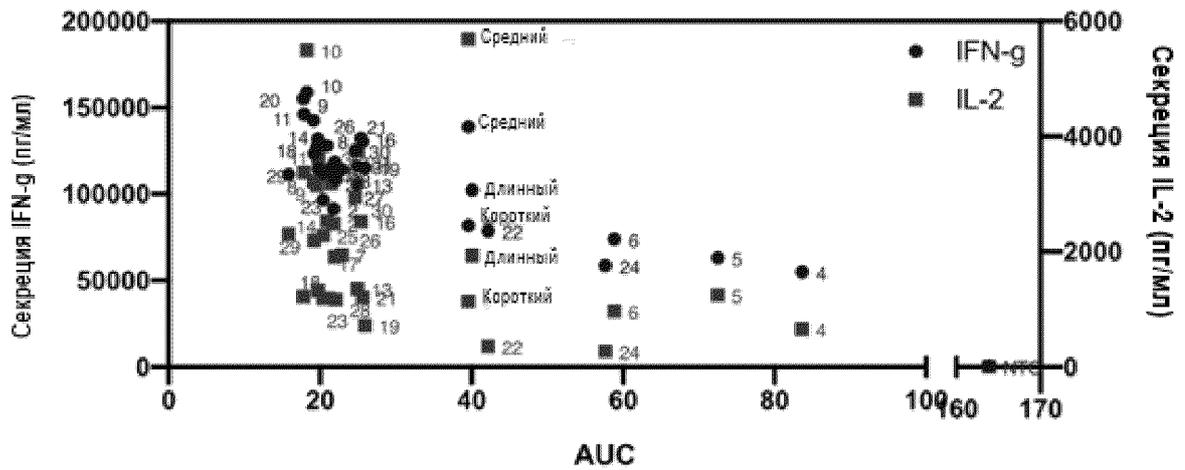
Зависимые от мишени цитокины D4869



ФИГ. 21С

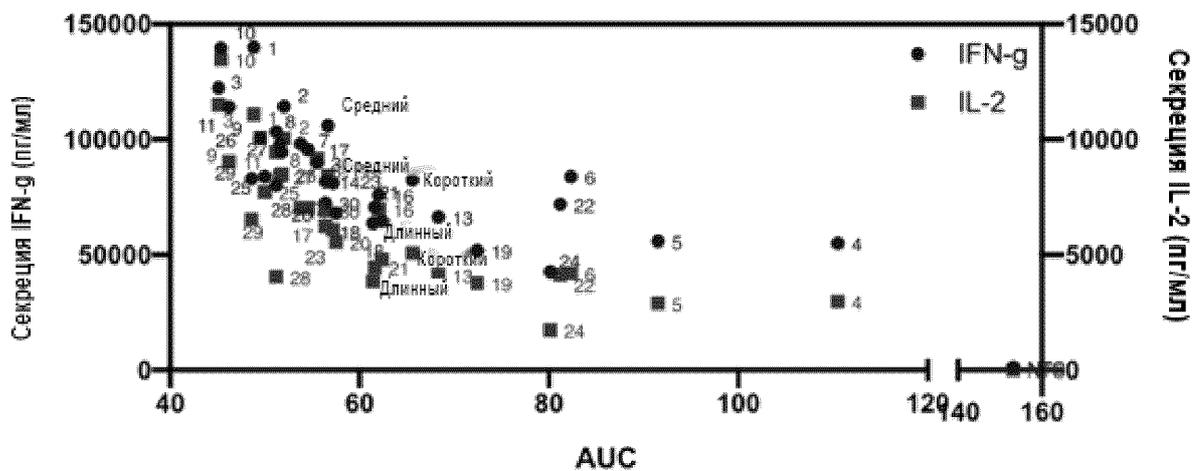
Цитокин и AUC CAR к CD19: Raji = 1:1

Т-клетки с CAR к CD19 3868: Raji = 1:1 AUC и Цитокины



ФИГ. 22А

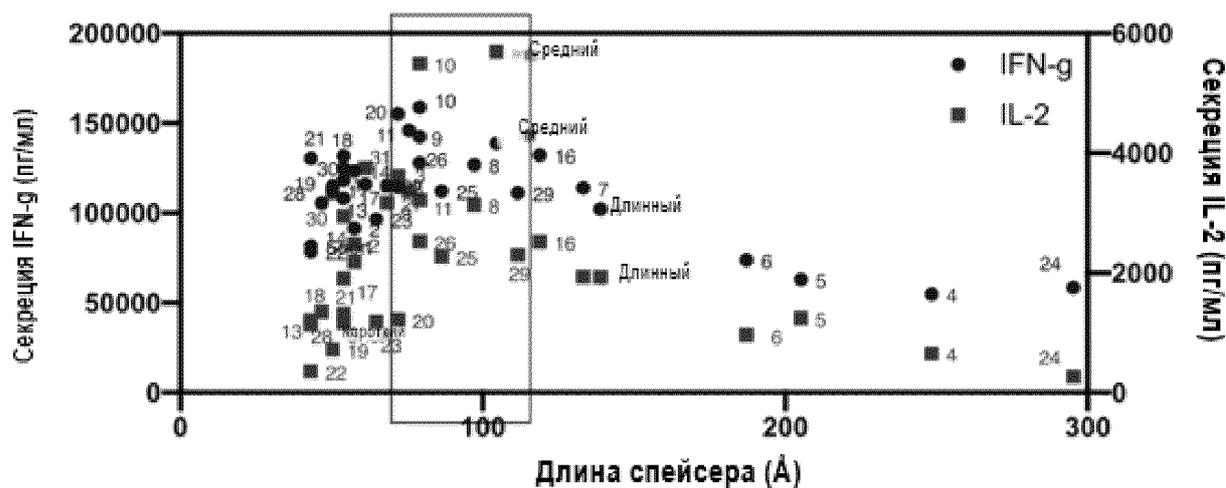
Т-клетки с CAR к CD19 4869: Raji 1:1 AUC и Цитокины



ФИГ. 22В

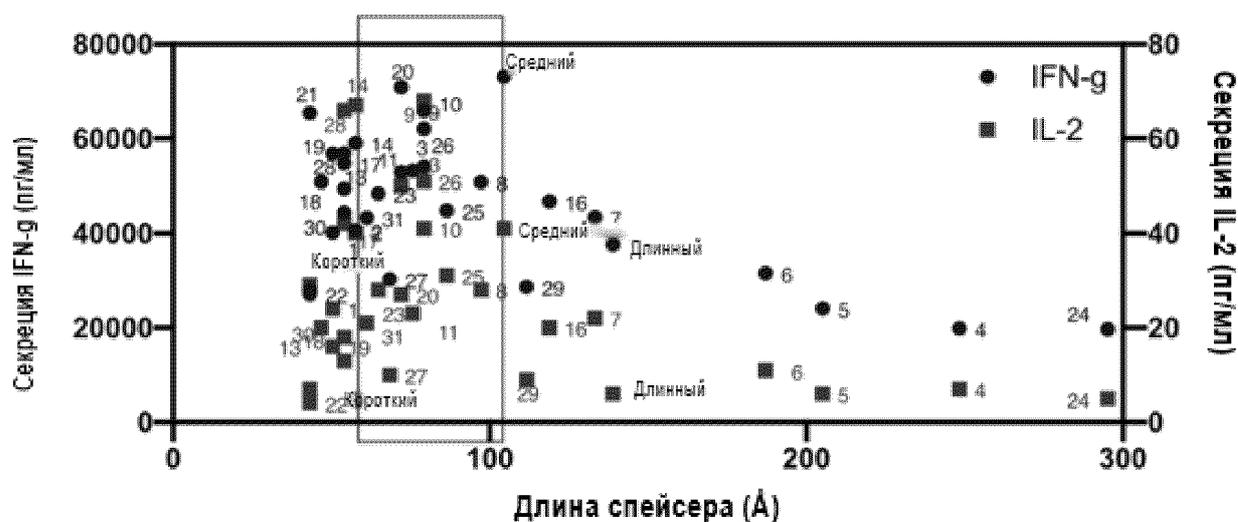
Цитокин и Длина спейсера CD19 E:T = 1:1

Т-клетки с CAR к CD19 3868: Raji 1:1 Длина спейсера и Цитокины



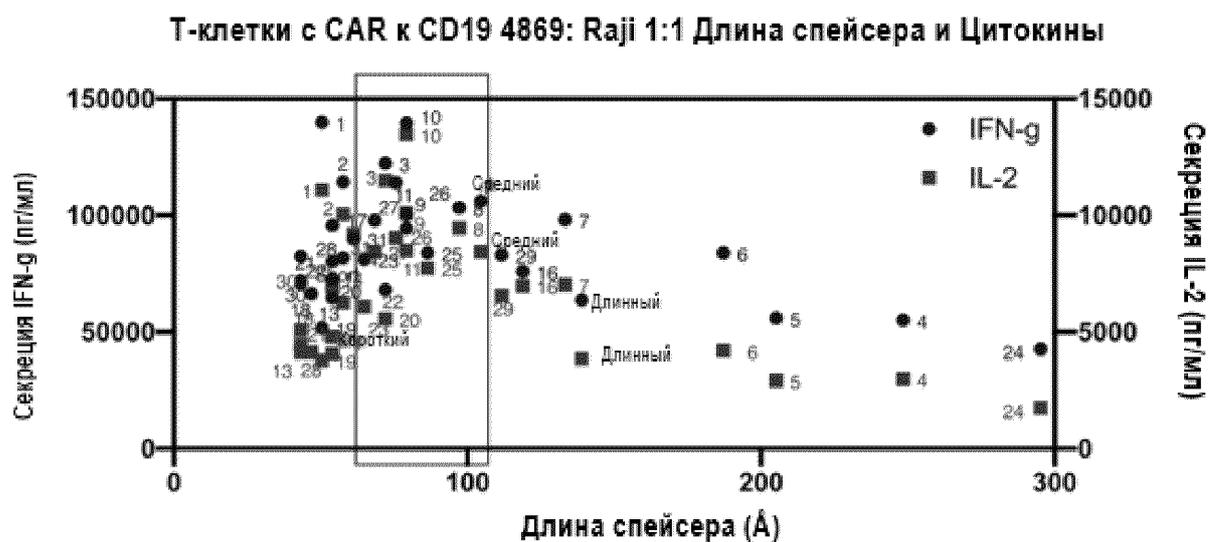
ФИГ. 23А

Т-клетки с CAR к CD19 3868: Nalm6 1:1 Длина спейсера и Цитокины

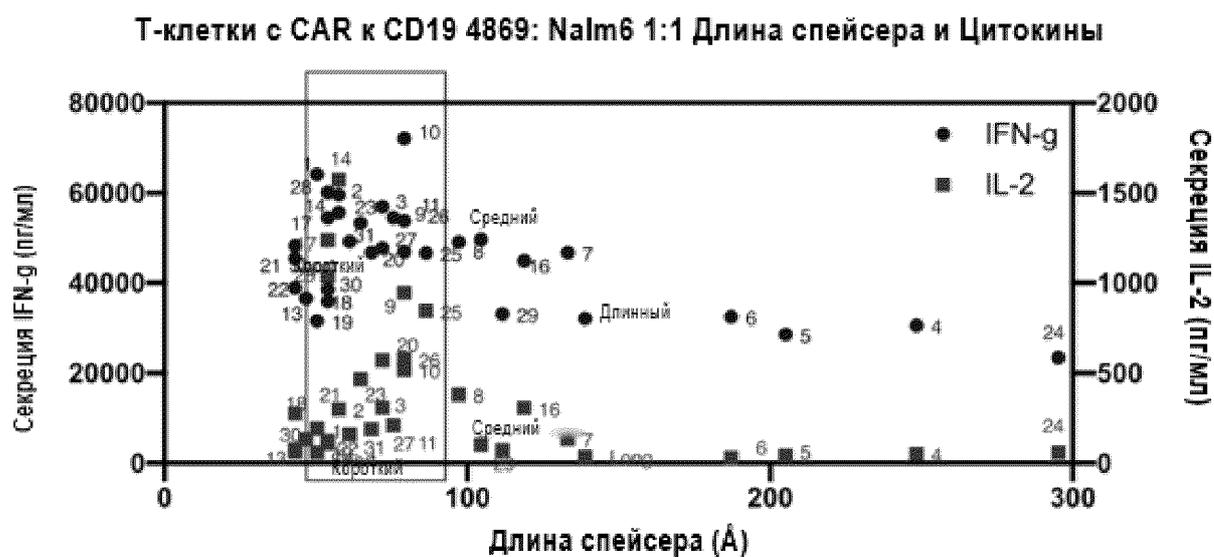


ФИГ. 23В

Цитокин и Длина спейсера CD19 E:T = 1:1



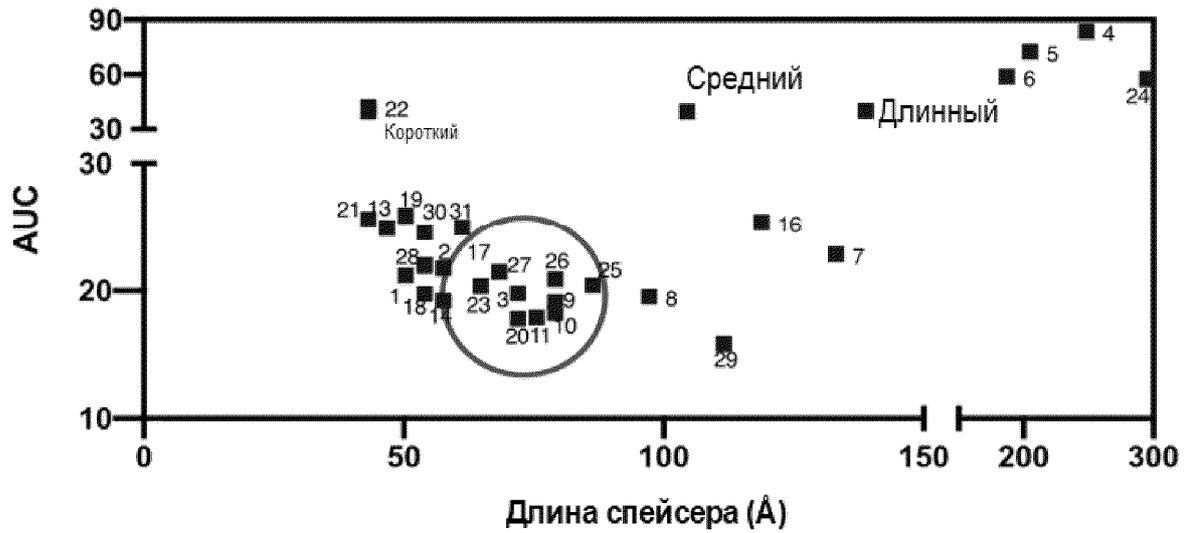
ФИГ. 23С



ФИГ. 23D

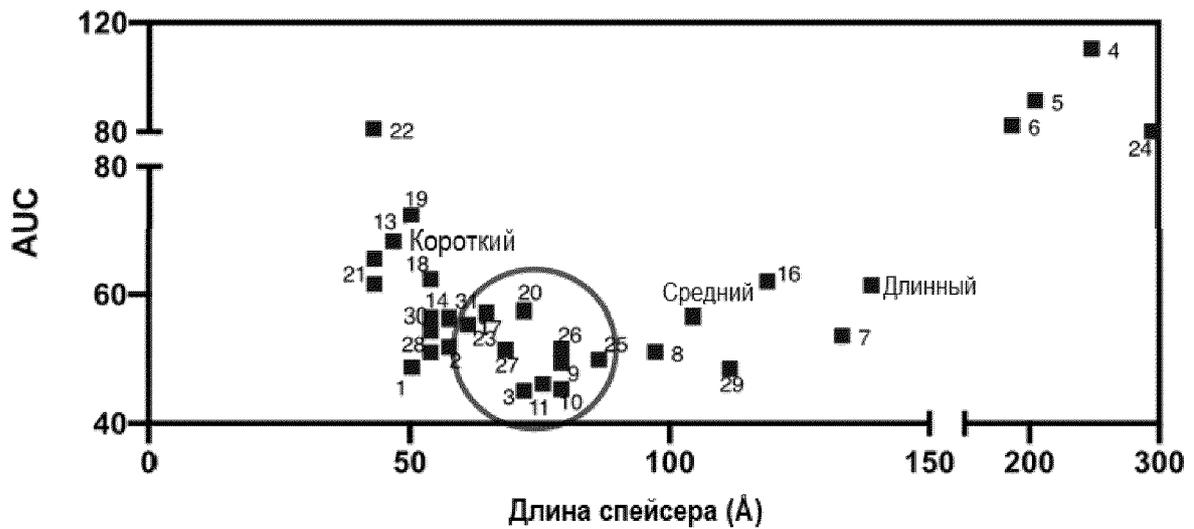
Длина спейсера и AUC CAR к CD19: R_{aj1} = 1:1

T-клетки с CAR к CD19 3868: R_{aj1} 1:1 AUC и Длина спейсера



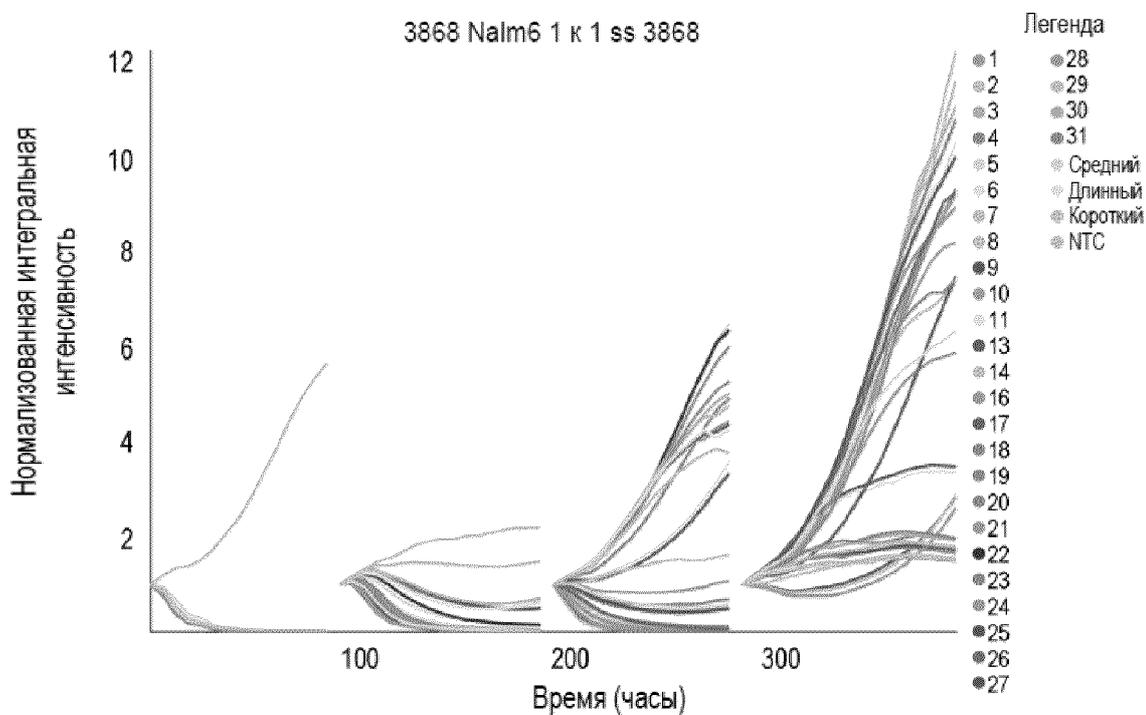
ФИГ. 24А

T-клетки с CAR к CD19 4869: R_{aj1} 1:1 AUC и Длина спейсера

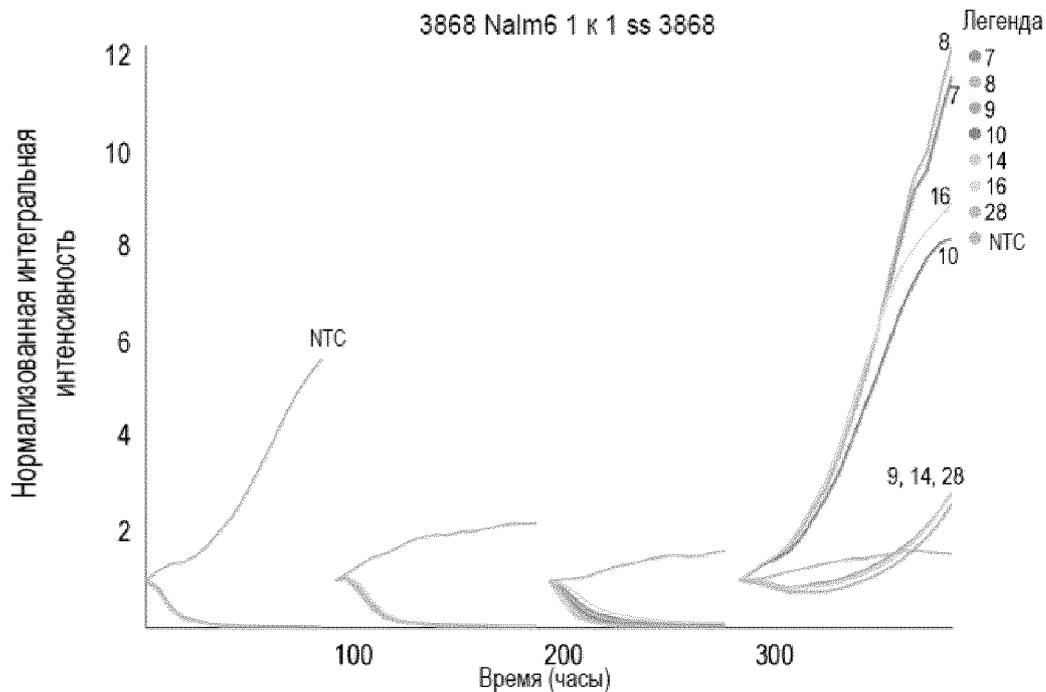


ФИГ. 24В

Последовательное
уничтожение Донор 3868



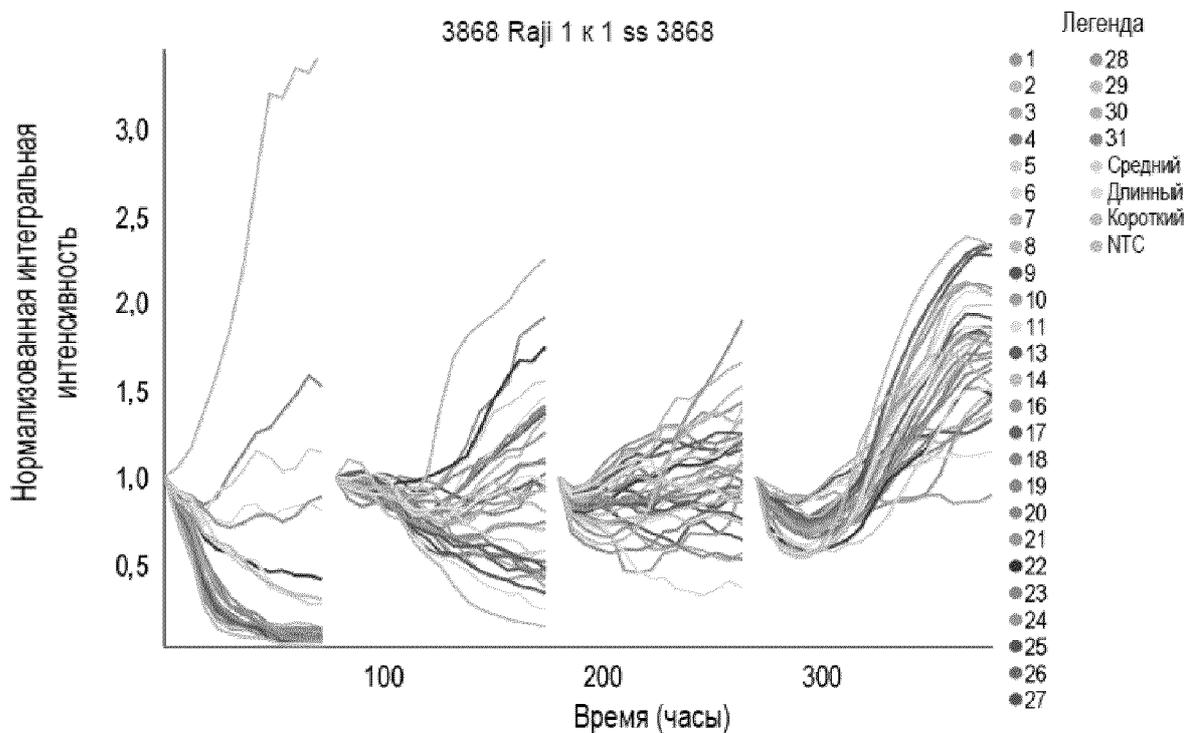
ФИГ. 25А



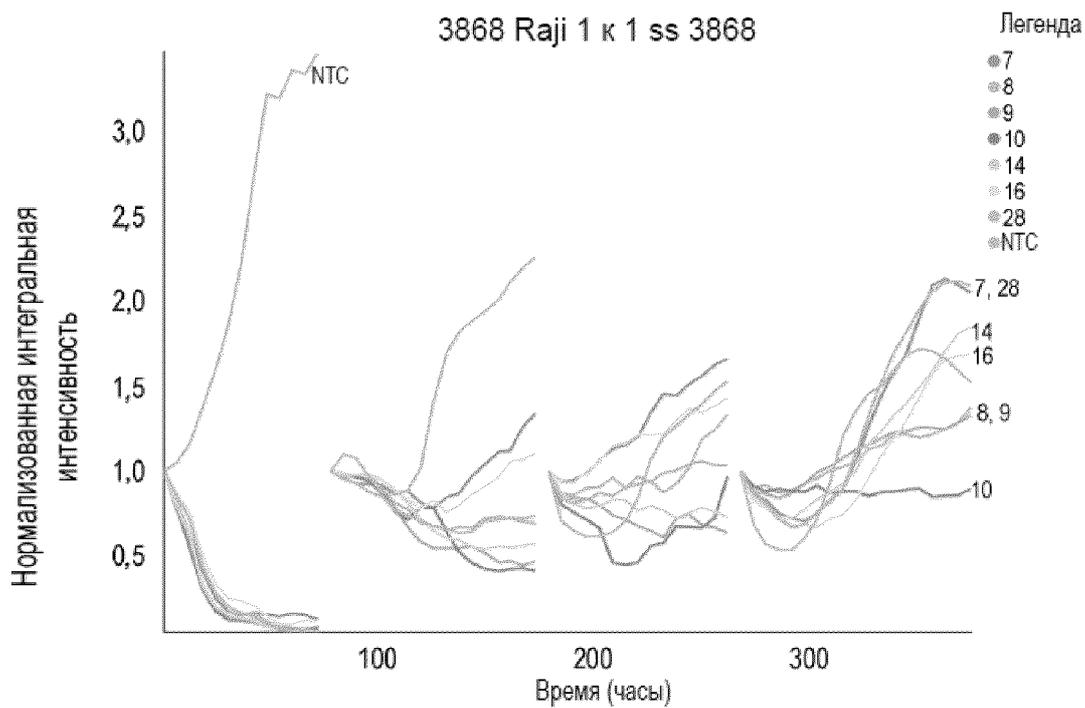
*Выделены наиболее эффективные конструкции

ФИГ. 25В

Последовательное
уничтожение Донор 3868



ФИГ. 25С



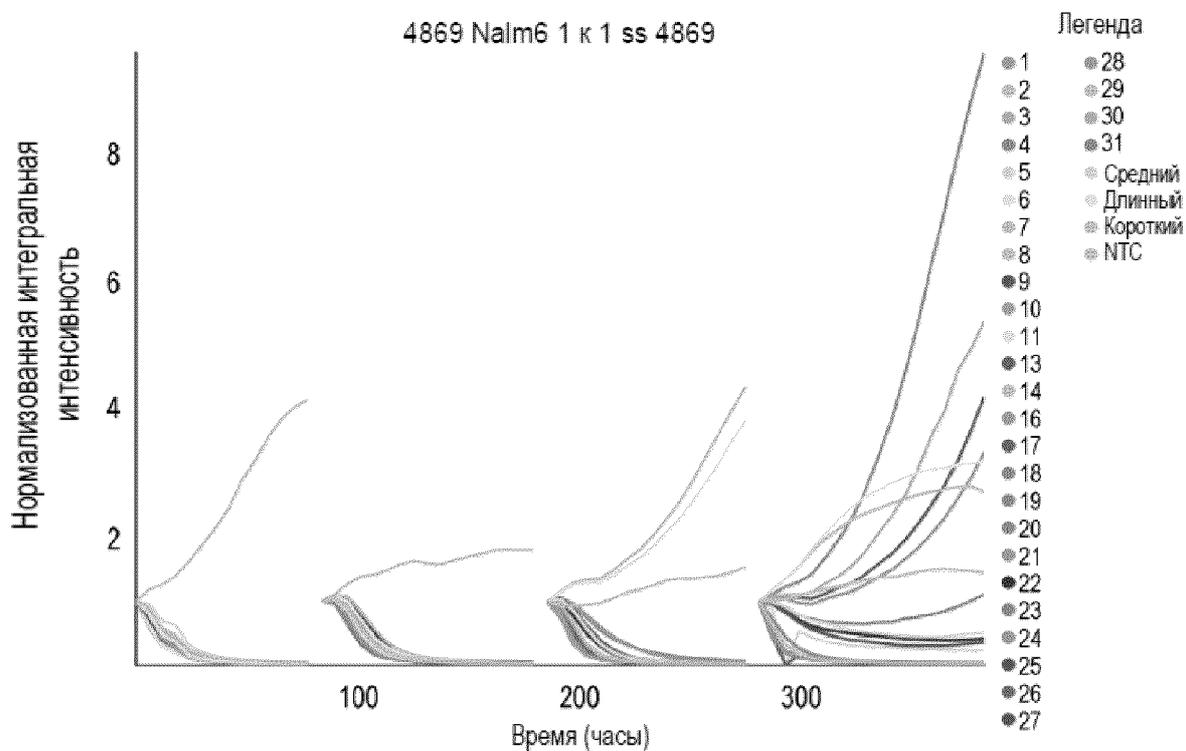
*Выделены наиболее эффективные конструкции

ФИГ. 25D

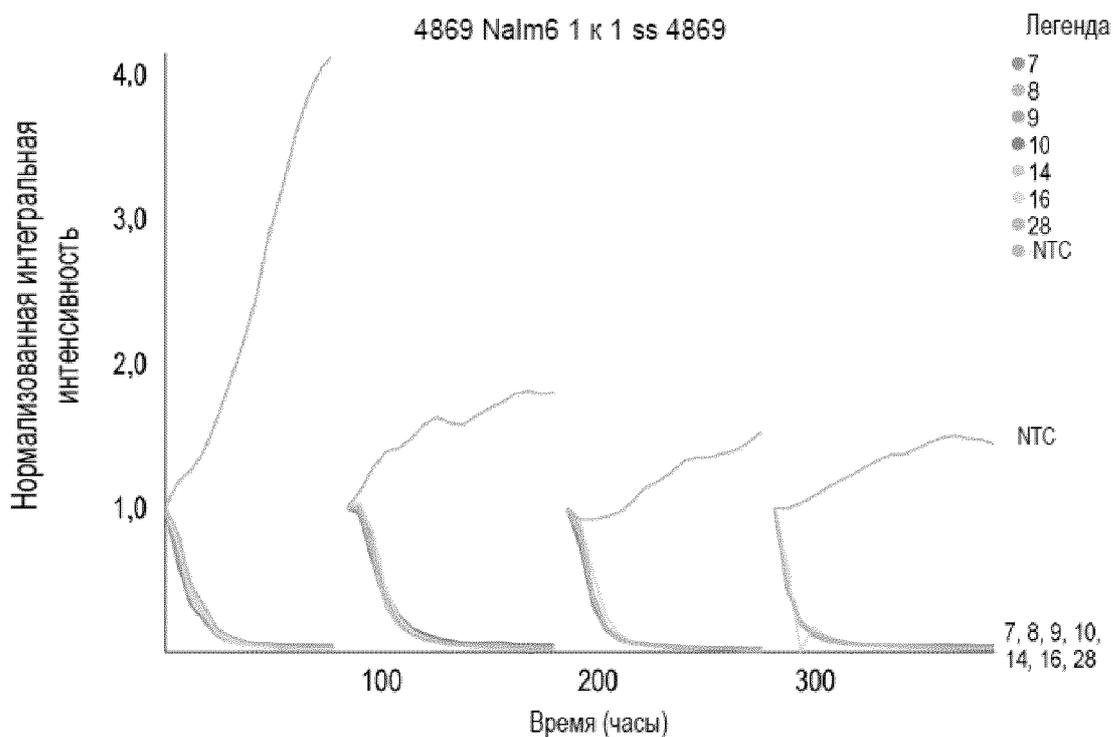
44/149

Последовательное уничтожение Донор 4869

4869 Nalm6 1 к 1 ss 4869

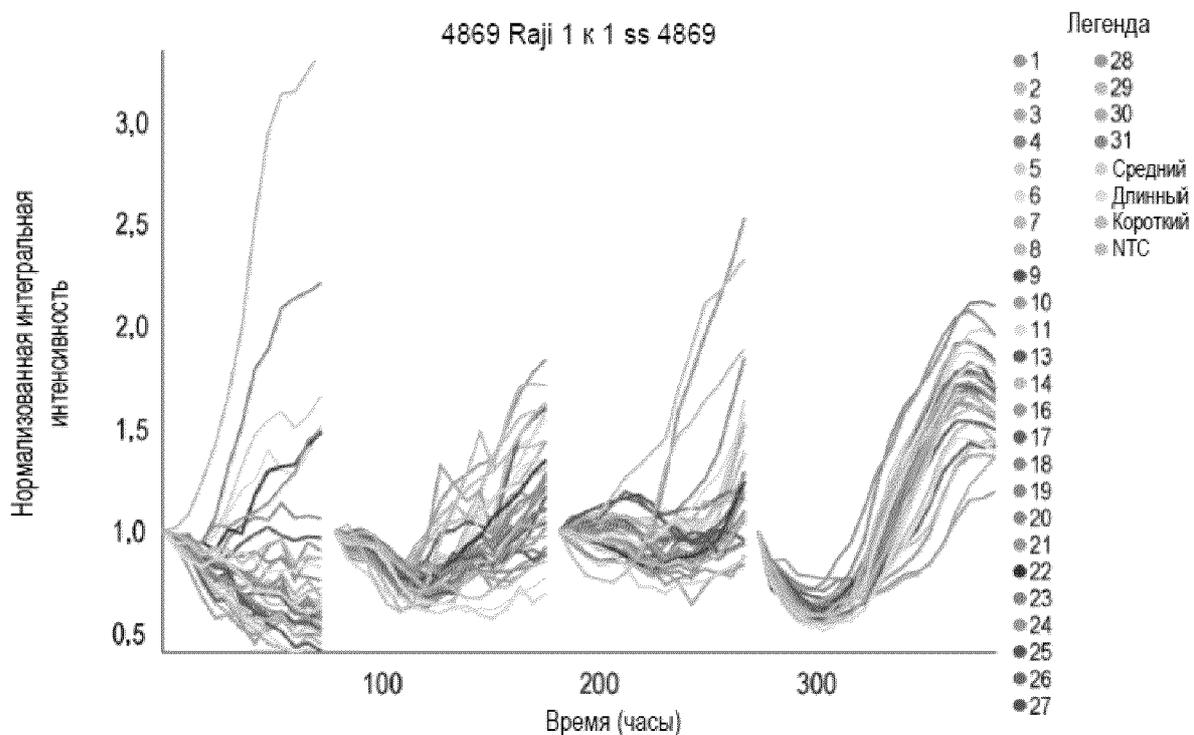


ФИГ. 26А

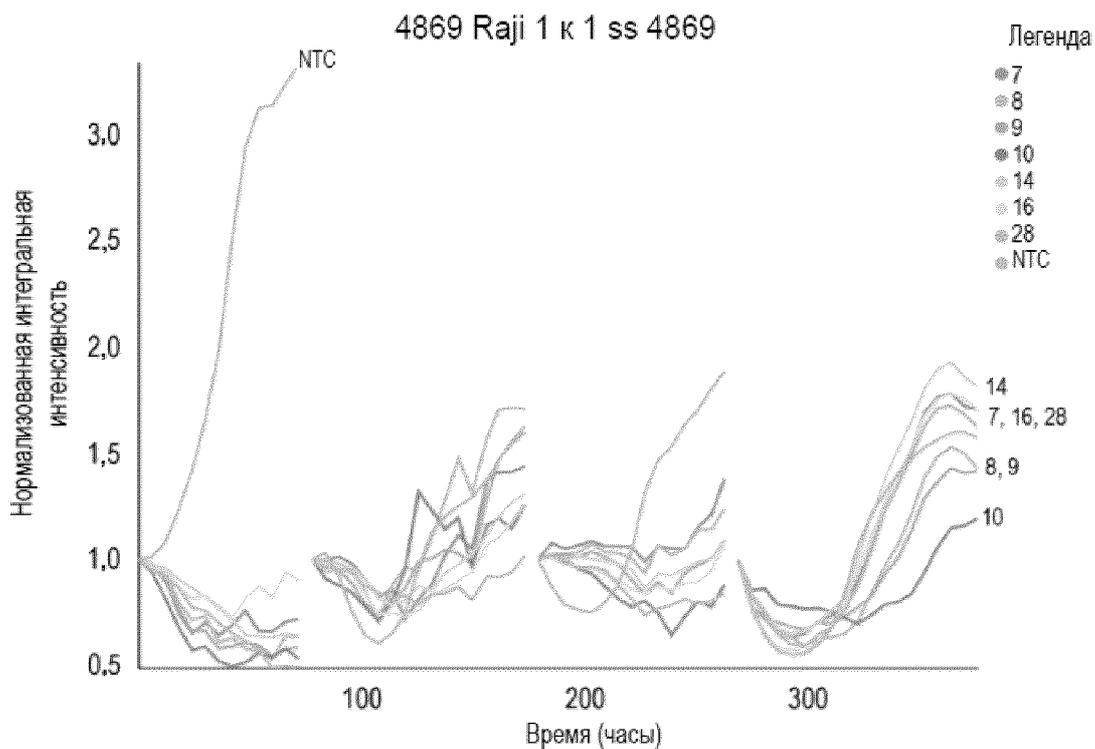


ФИГ. 26В

Последовательное
уничтожение Донор 4869

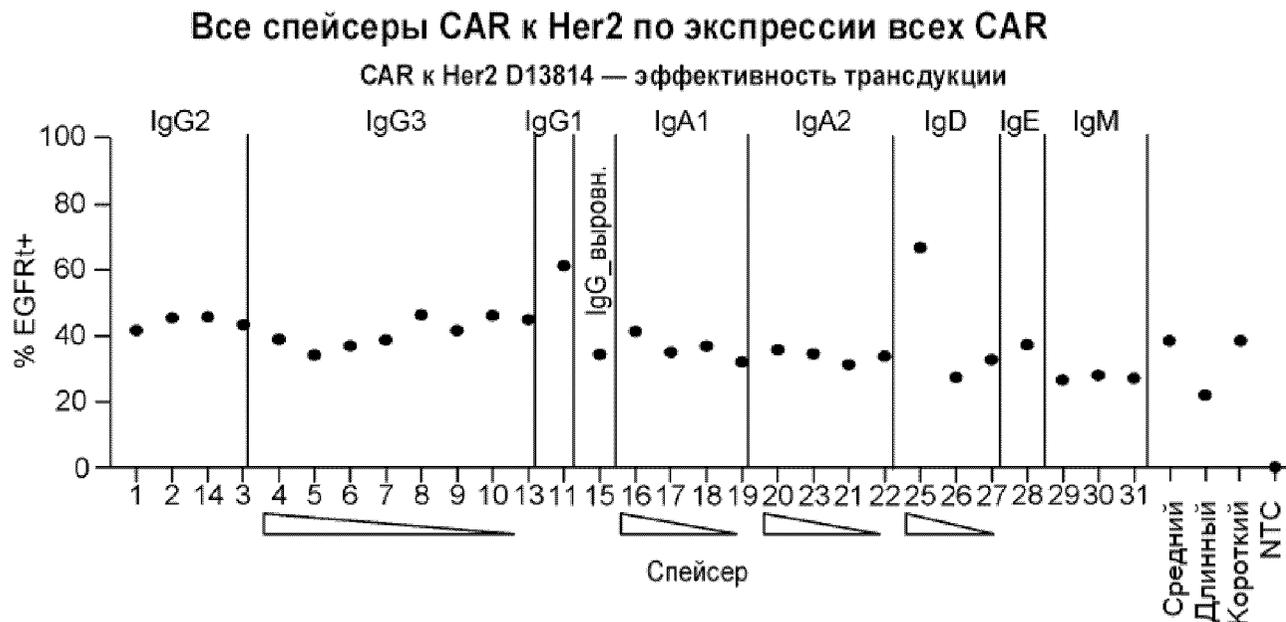


ФИГ. 26С

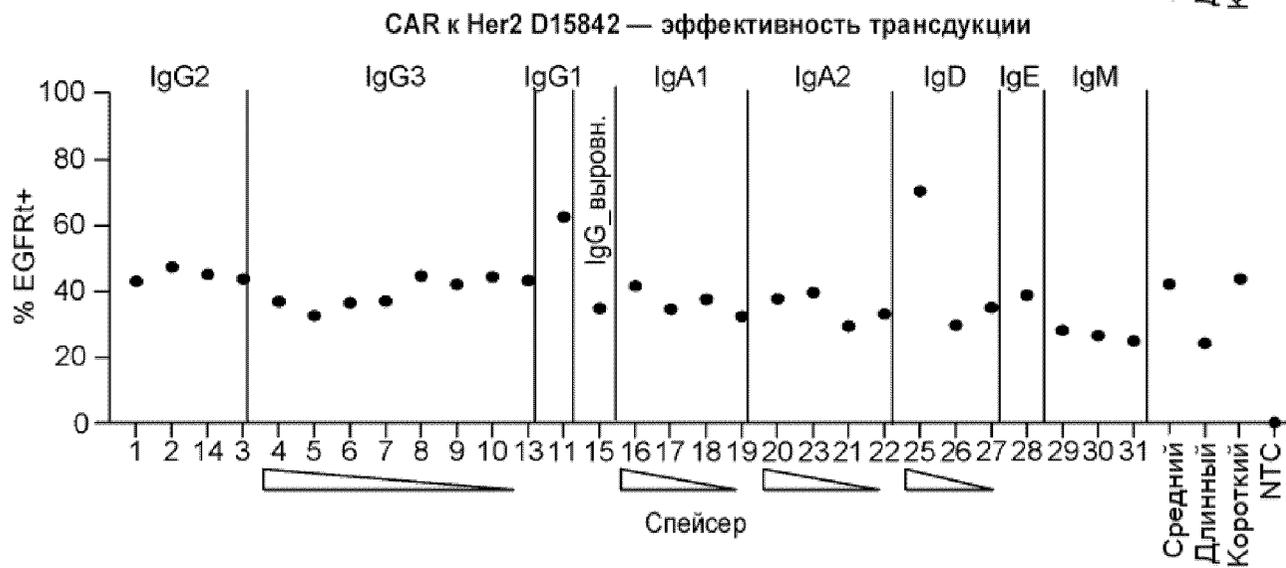


ФИГ. 26D

ФИГ. 27А



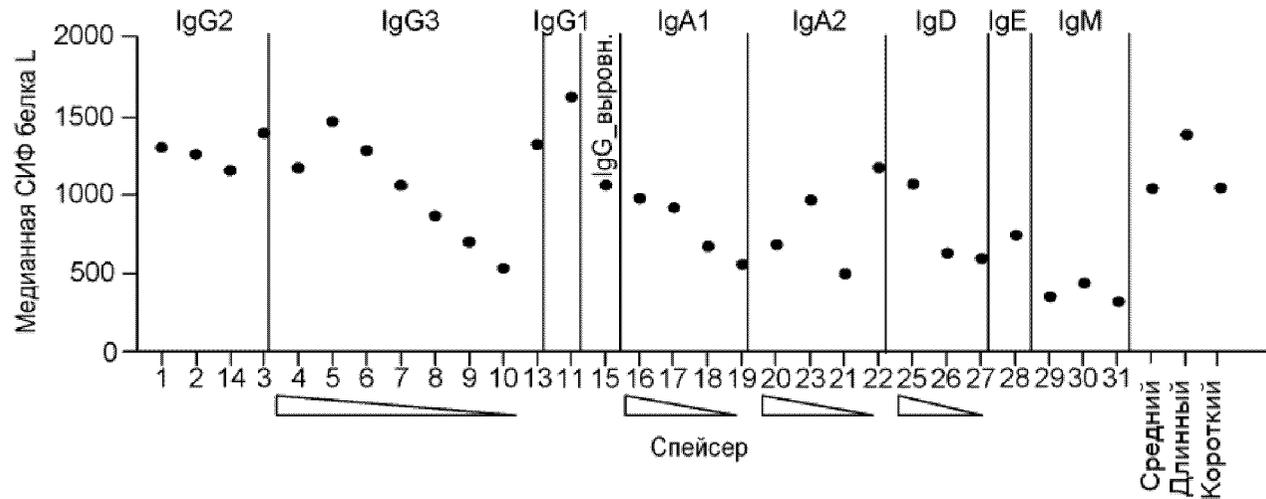
ФИГ. 27В



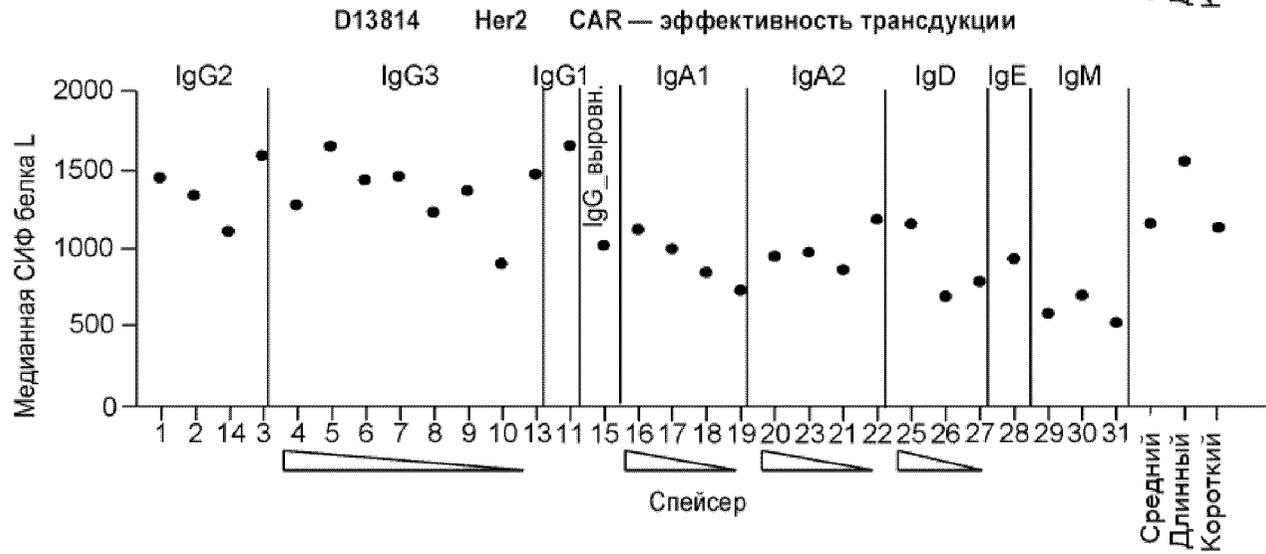
Все спейсеры Her2 по экспрессии всех CAR

D13814 Her2 CAR— эффективность трансдукции

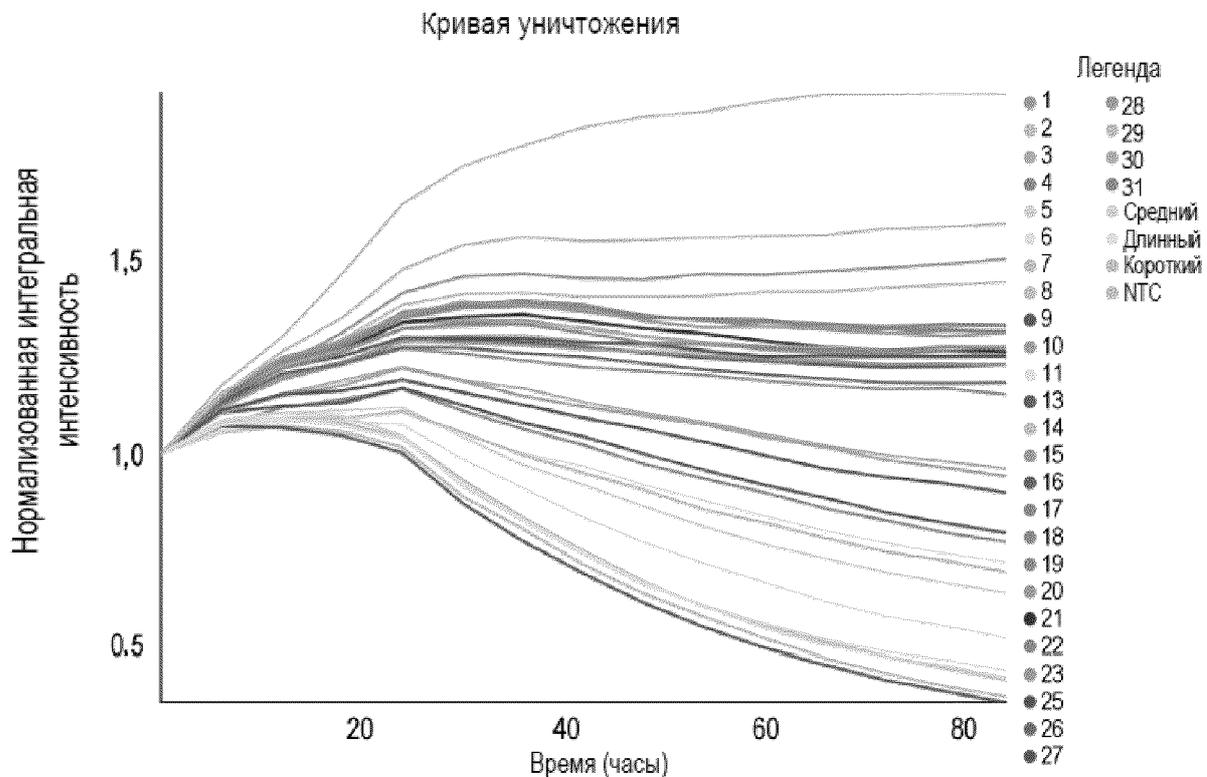
ФИГ. 27C



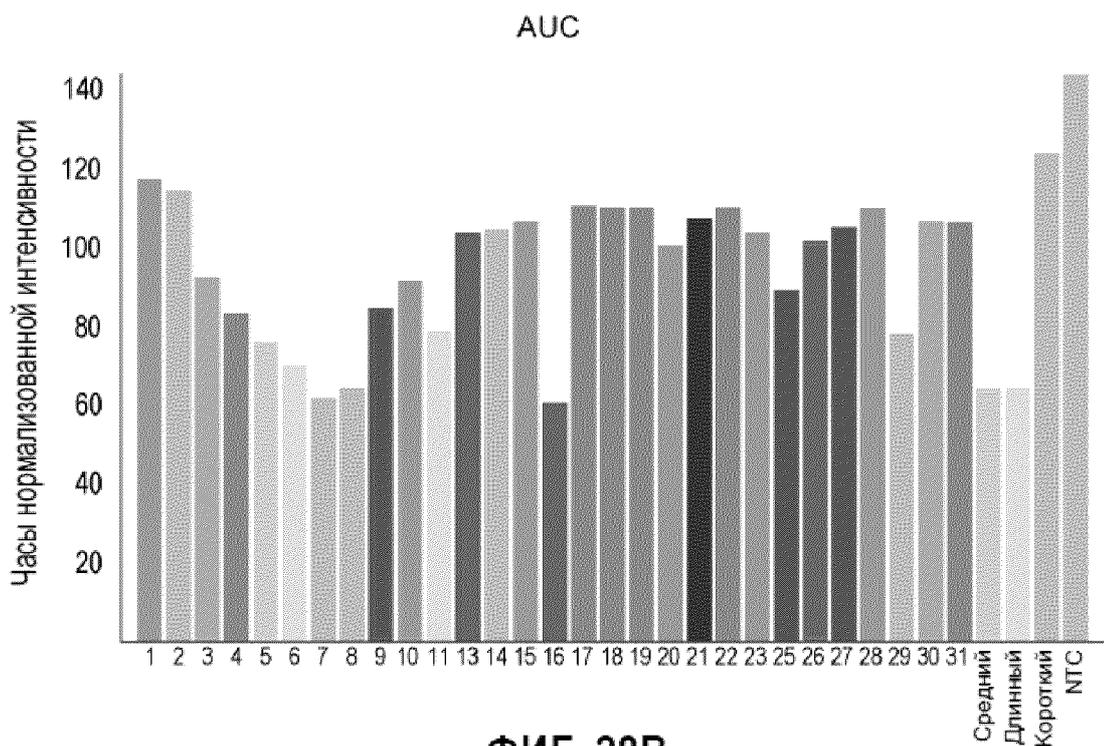
ФИГ. 27D



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D13814: A549-NLR 1:1



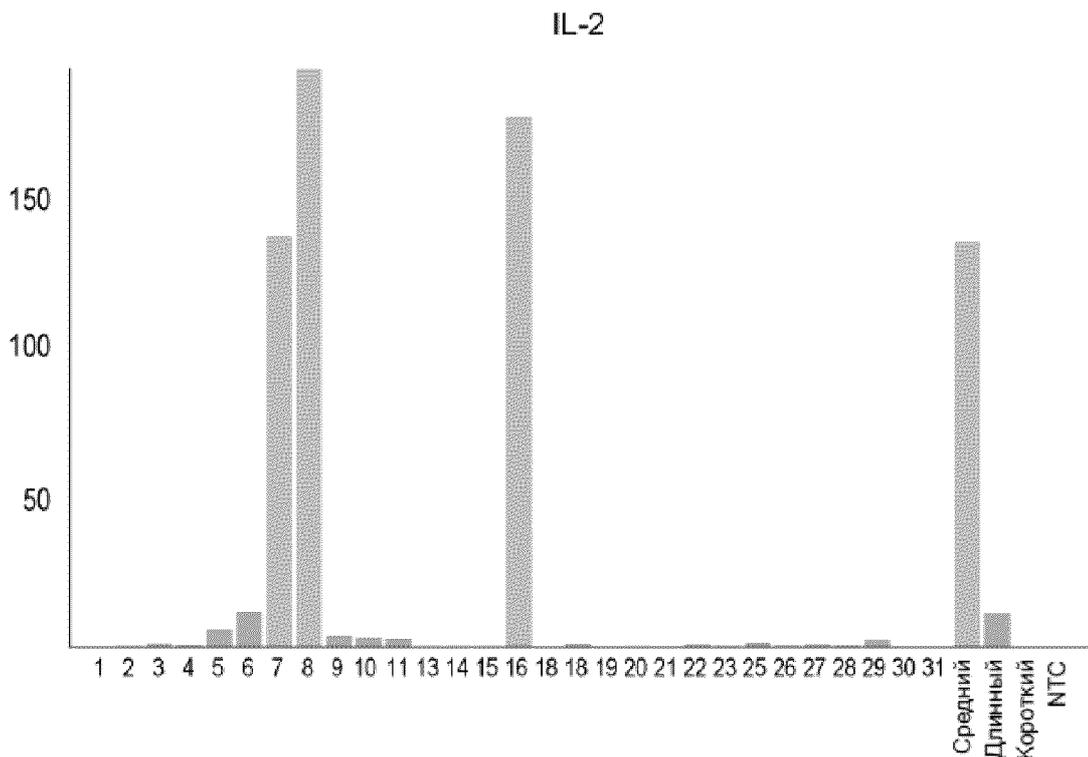
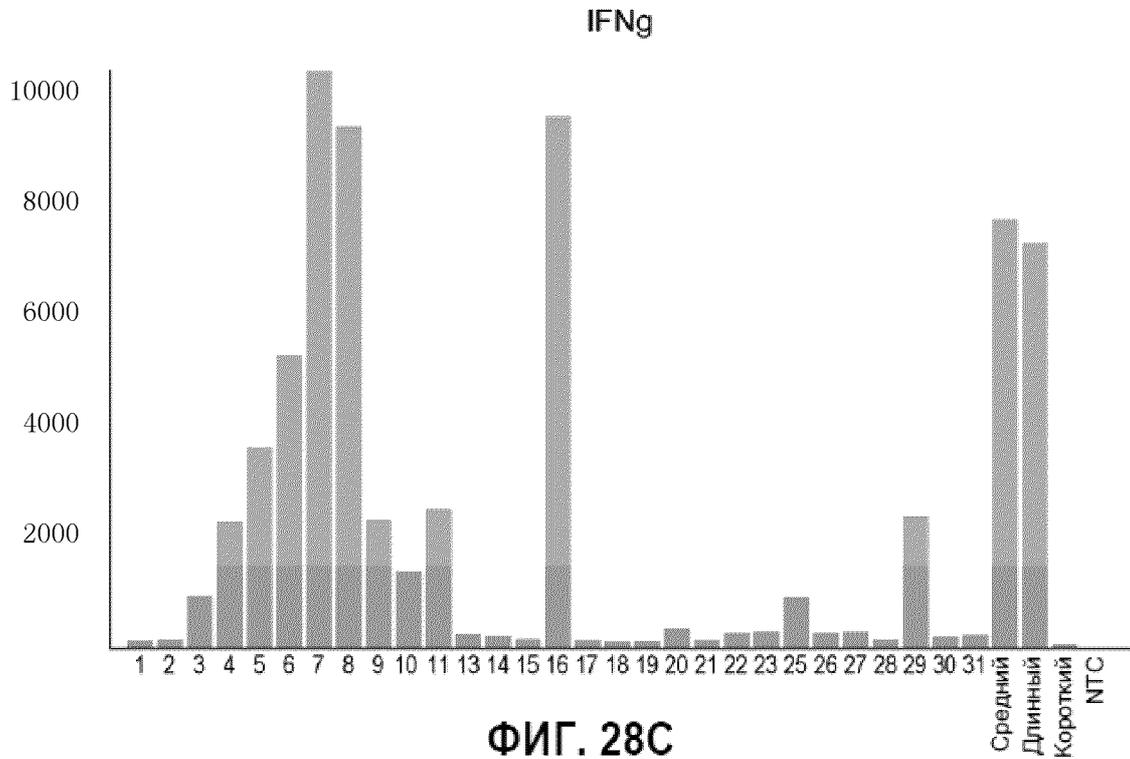
ФИГ. 28А



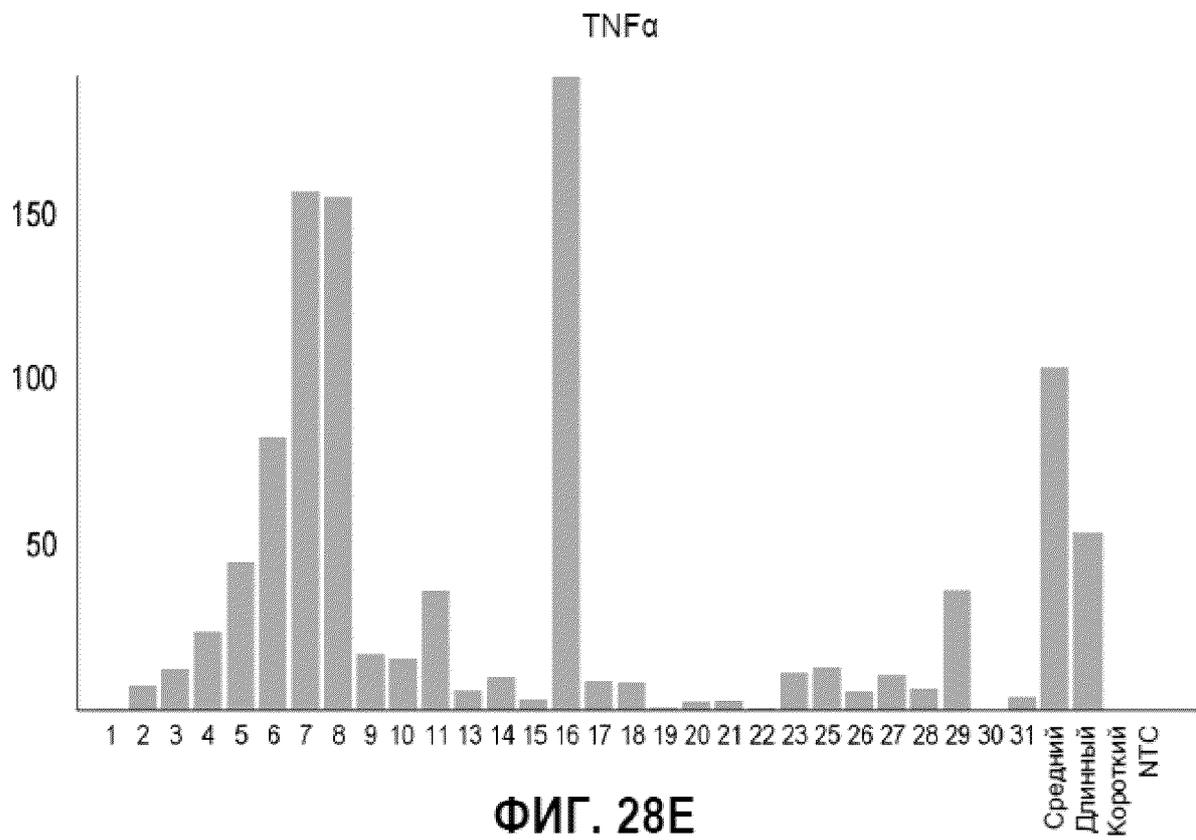
ФИГ. 28В

49/149

Первичное уничтожение и AUC CAR-T D13814: A549-NLR 1:1

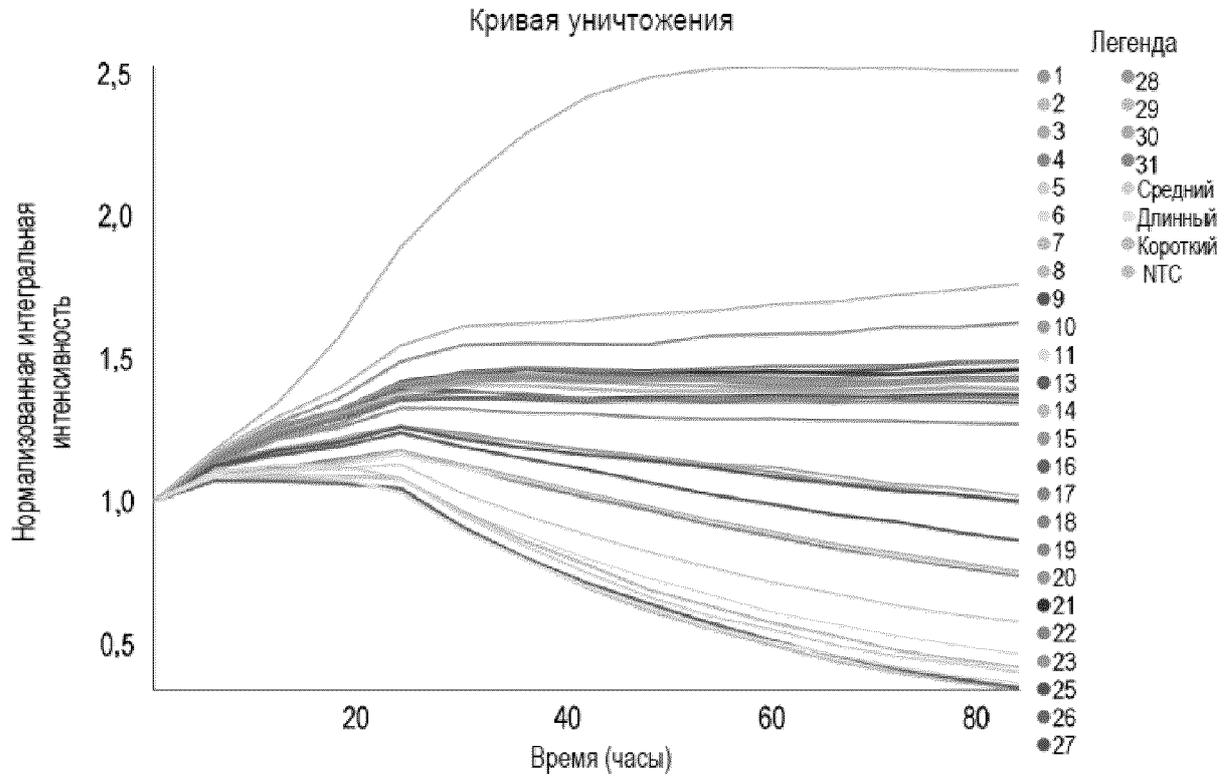


Первичное уничтожение и AUC CAR-T D13814: A549-NLR 1:1

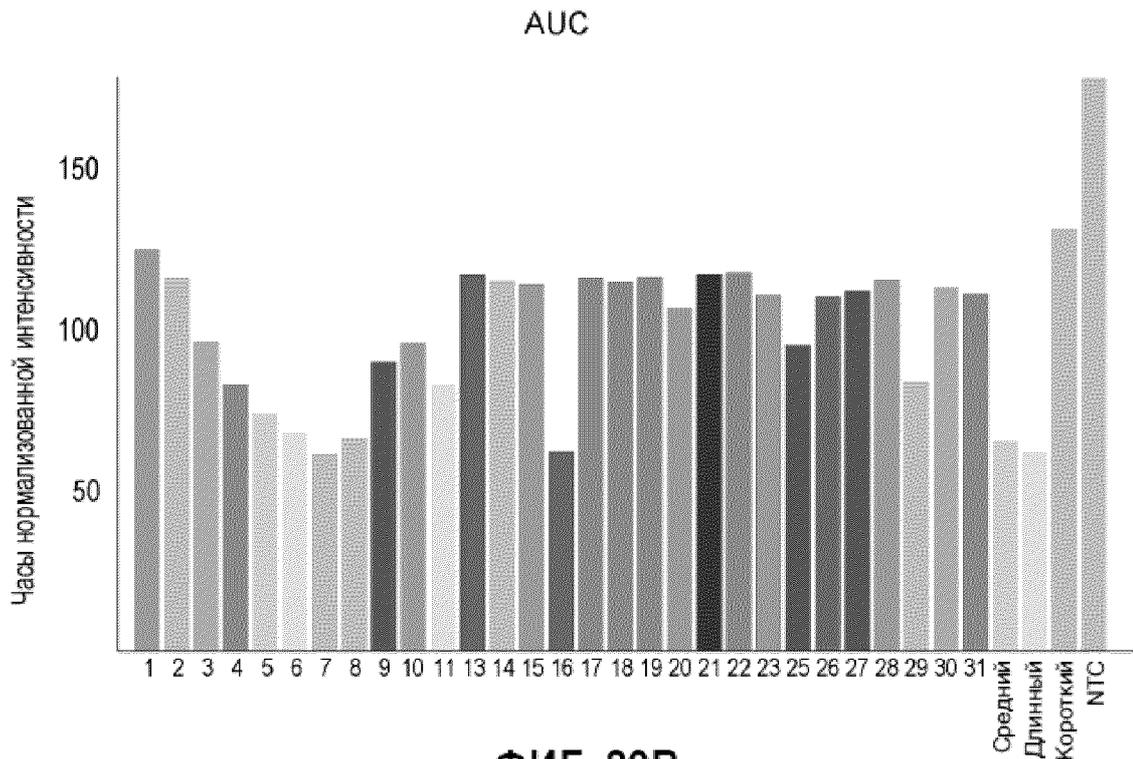


51/149

Первичное уничтожение и AUC CAR-T D15842: A549-NLR 1:1



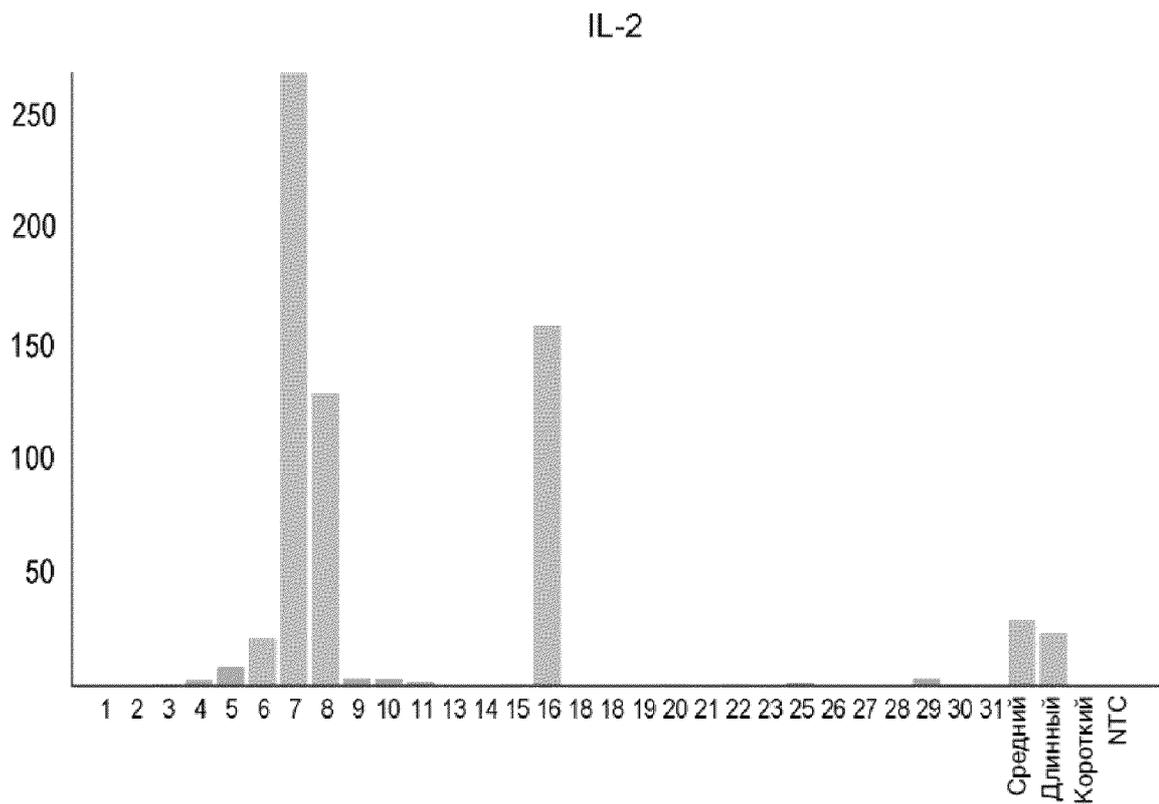
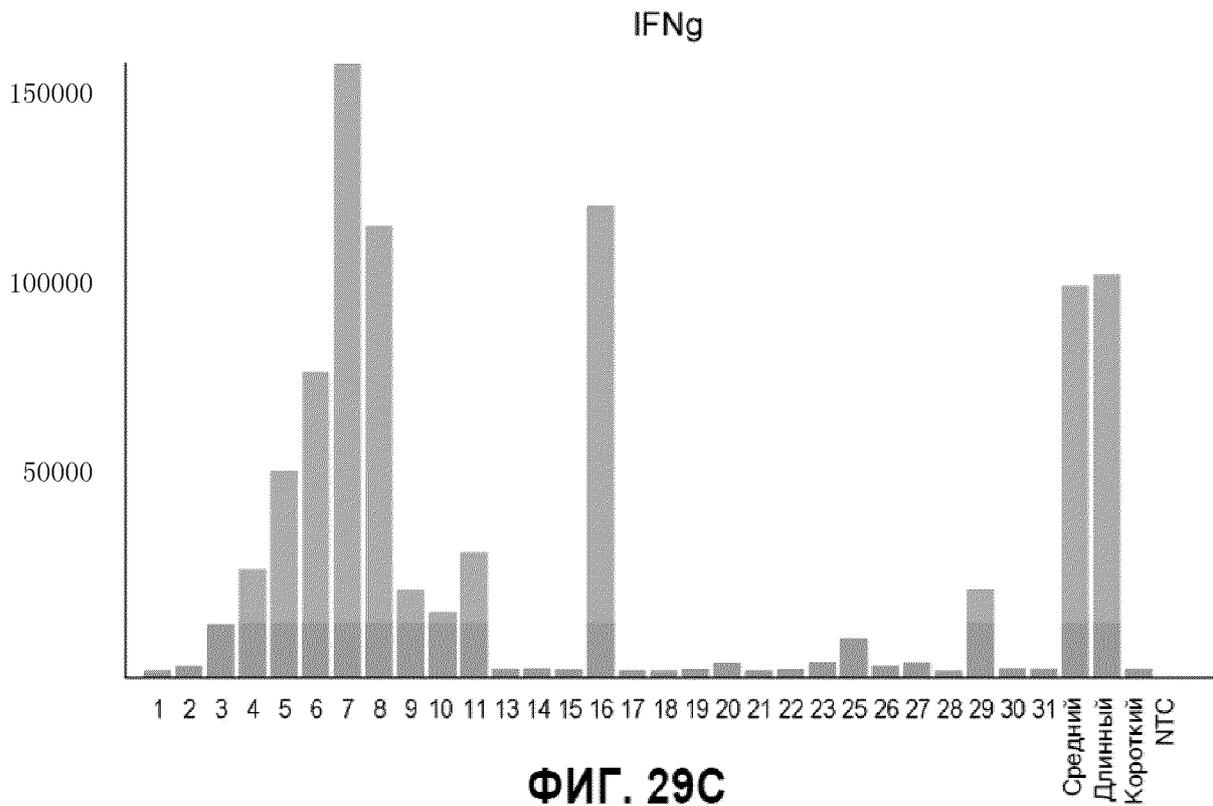
ФИГ. 29А



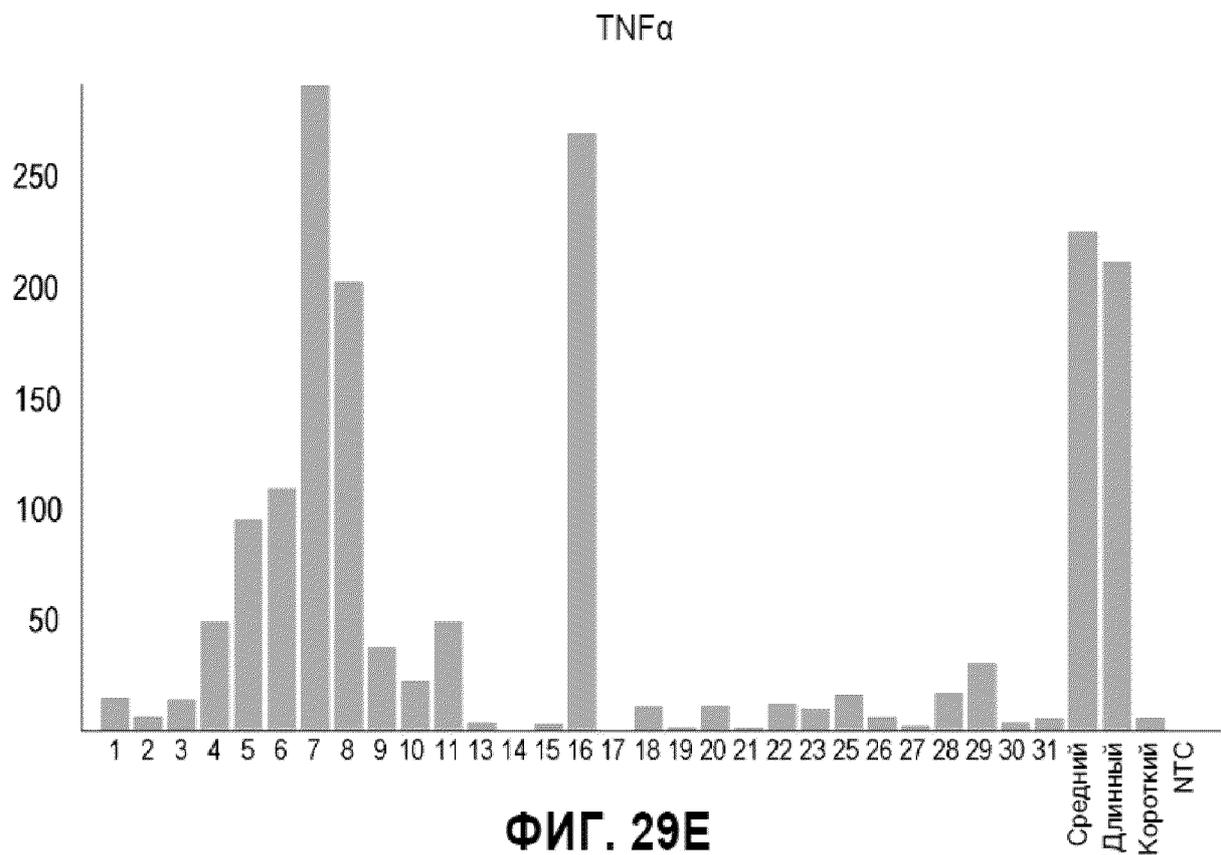
ФИГ. 29В

52/149

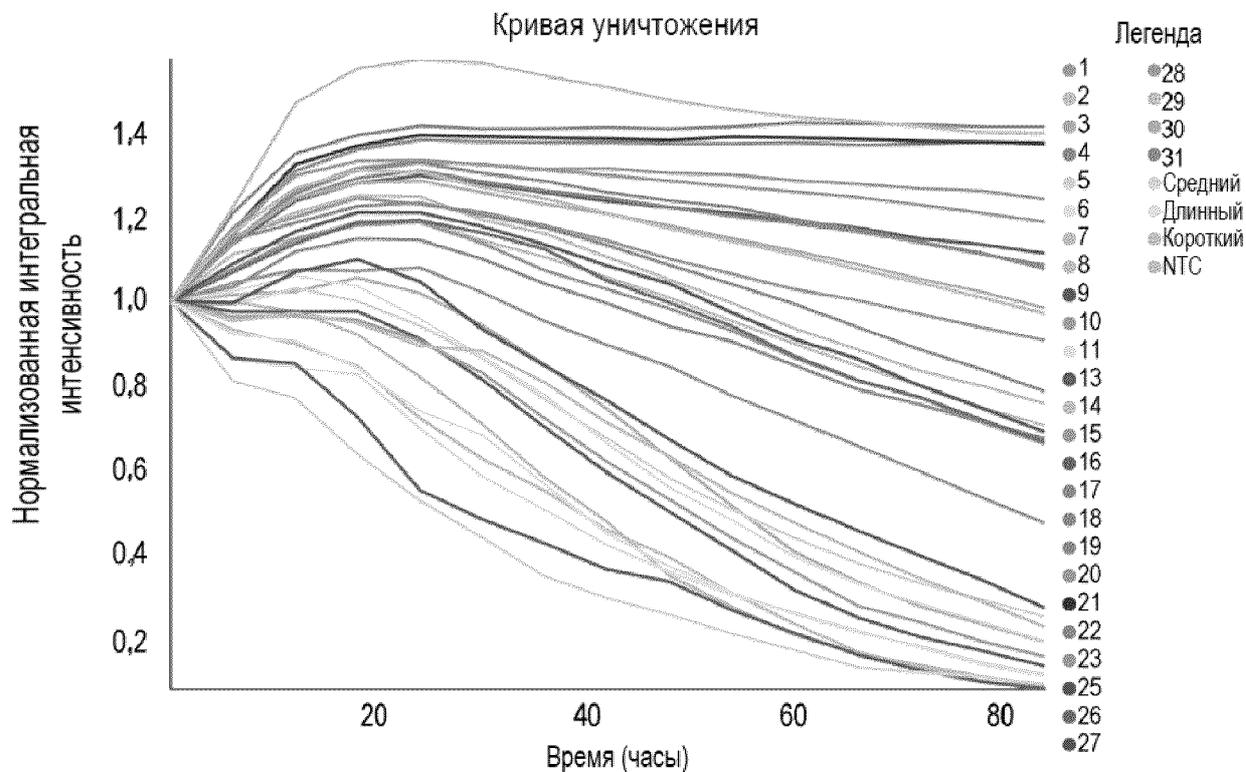
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D15842: A549-NLR 1:1



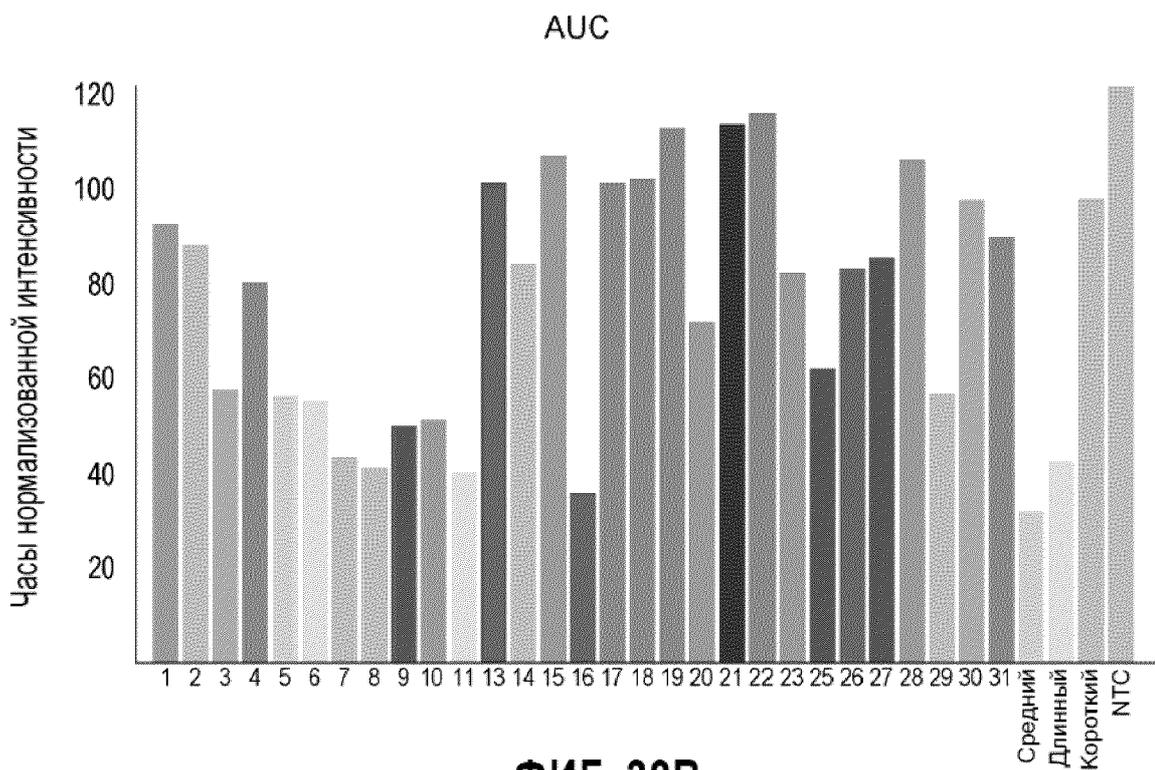
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D15842: A549-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D13814: T47D-NLR 1:1



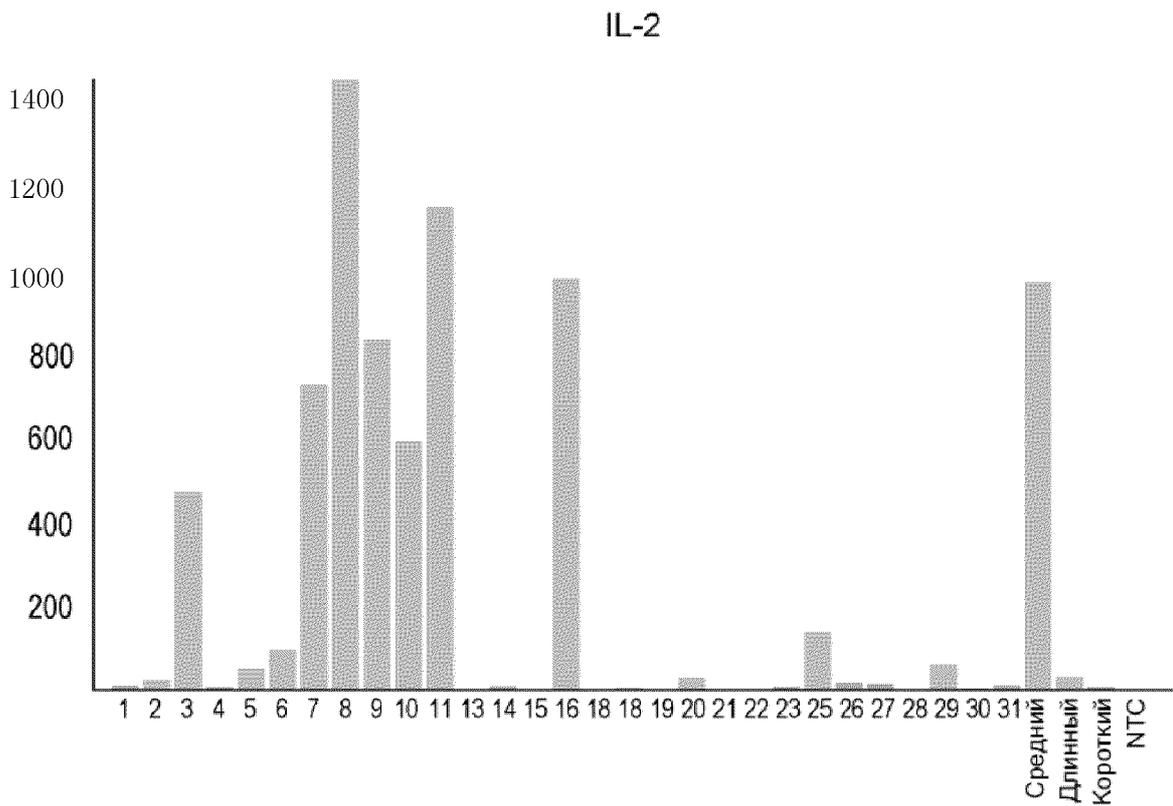
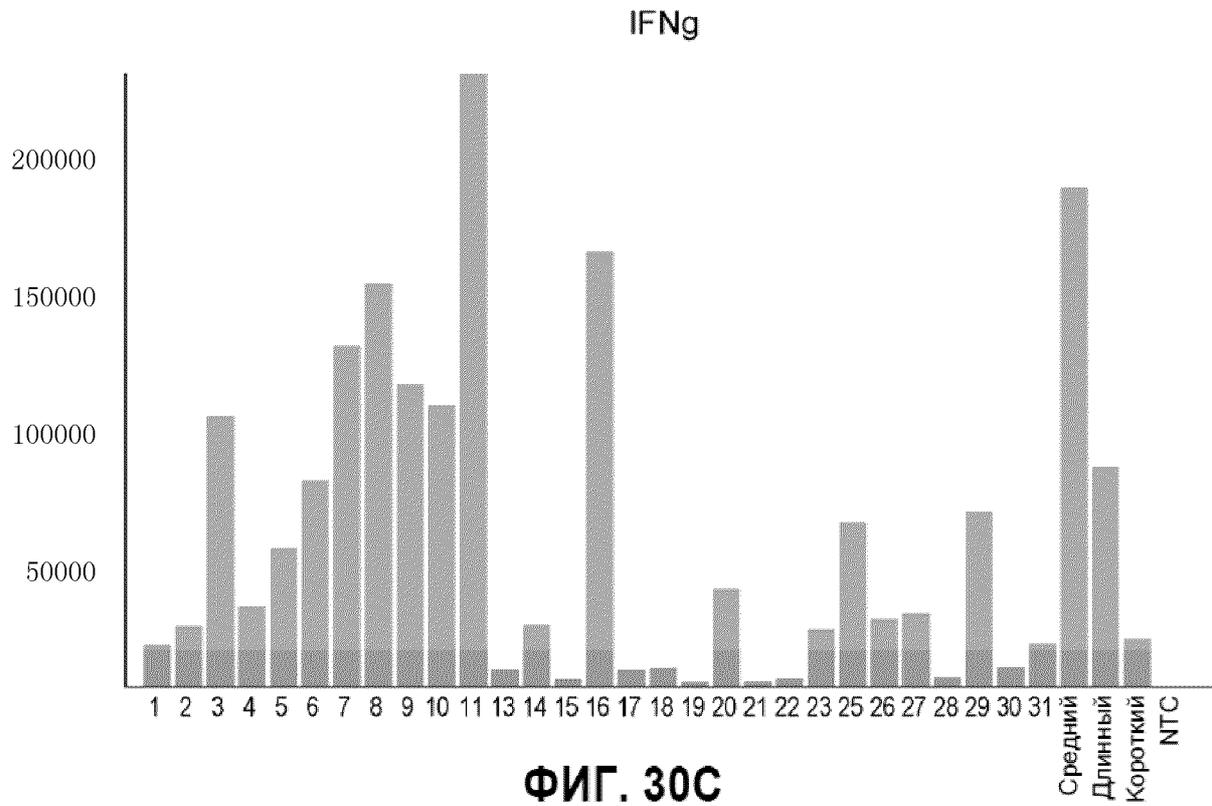
ФИГ. 30А



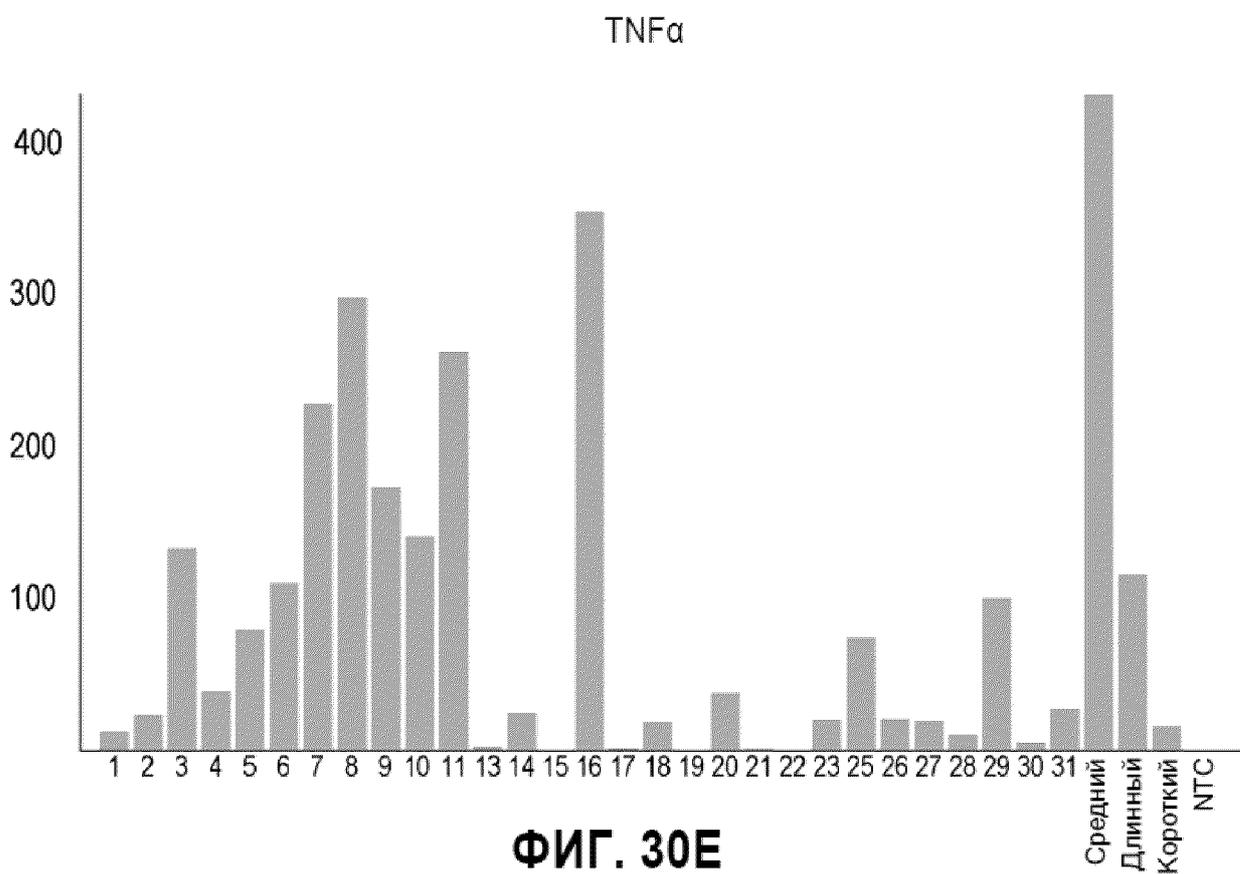
ФИГ. 30В

55/149

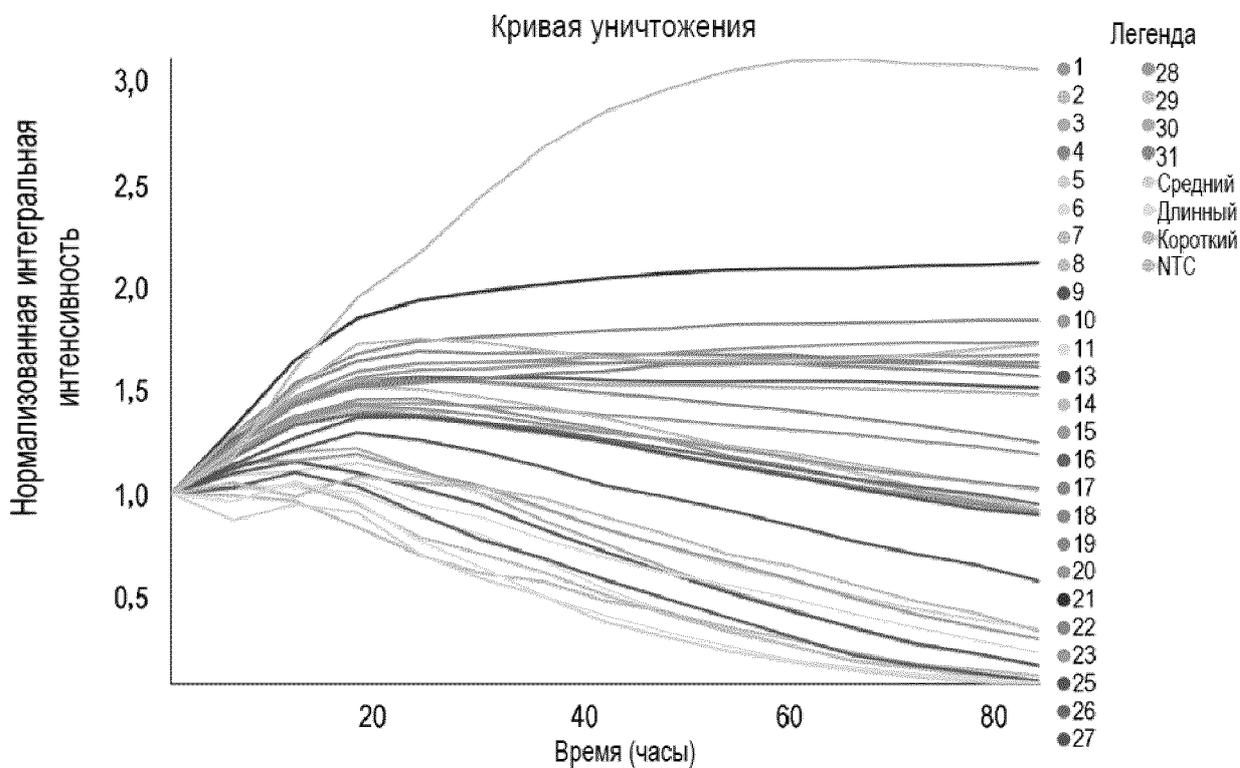
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D13814: T47D-NLR 1:1



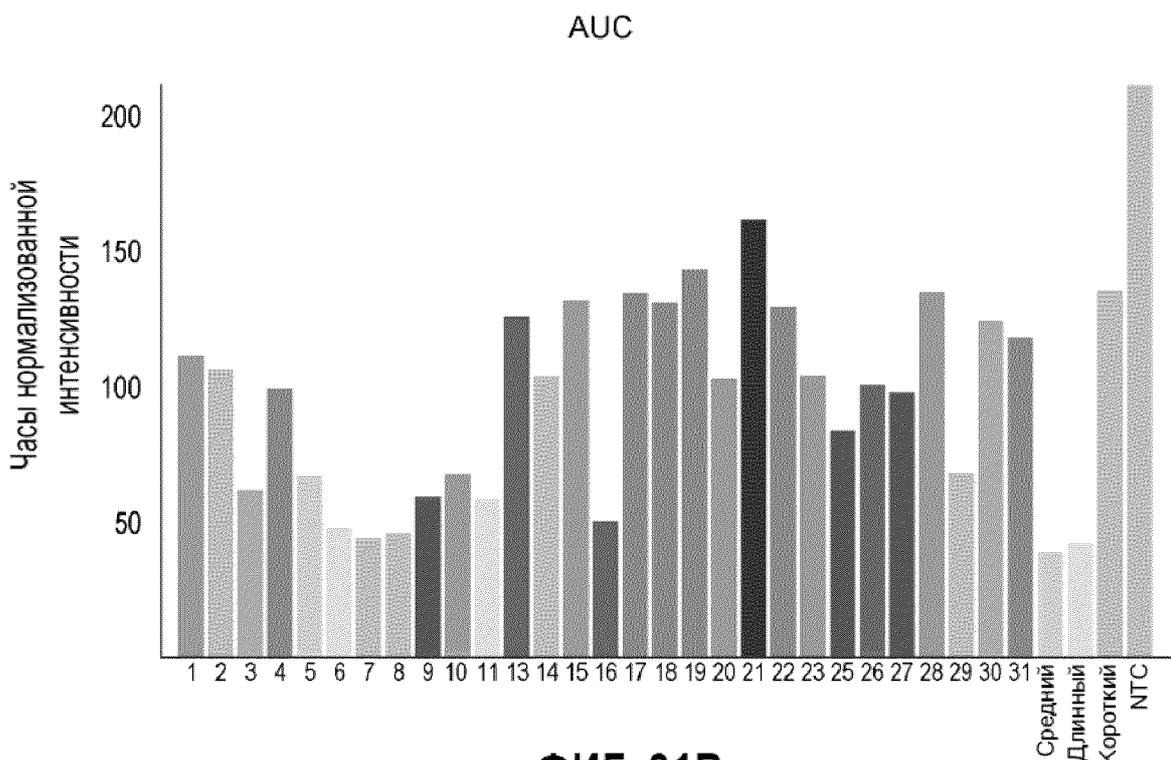
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D13814: T47D-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D15842: T47D-NLR 1:1



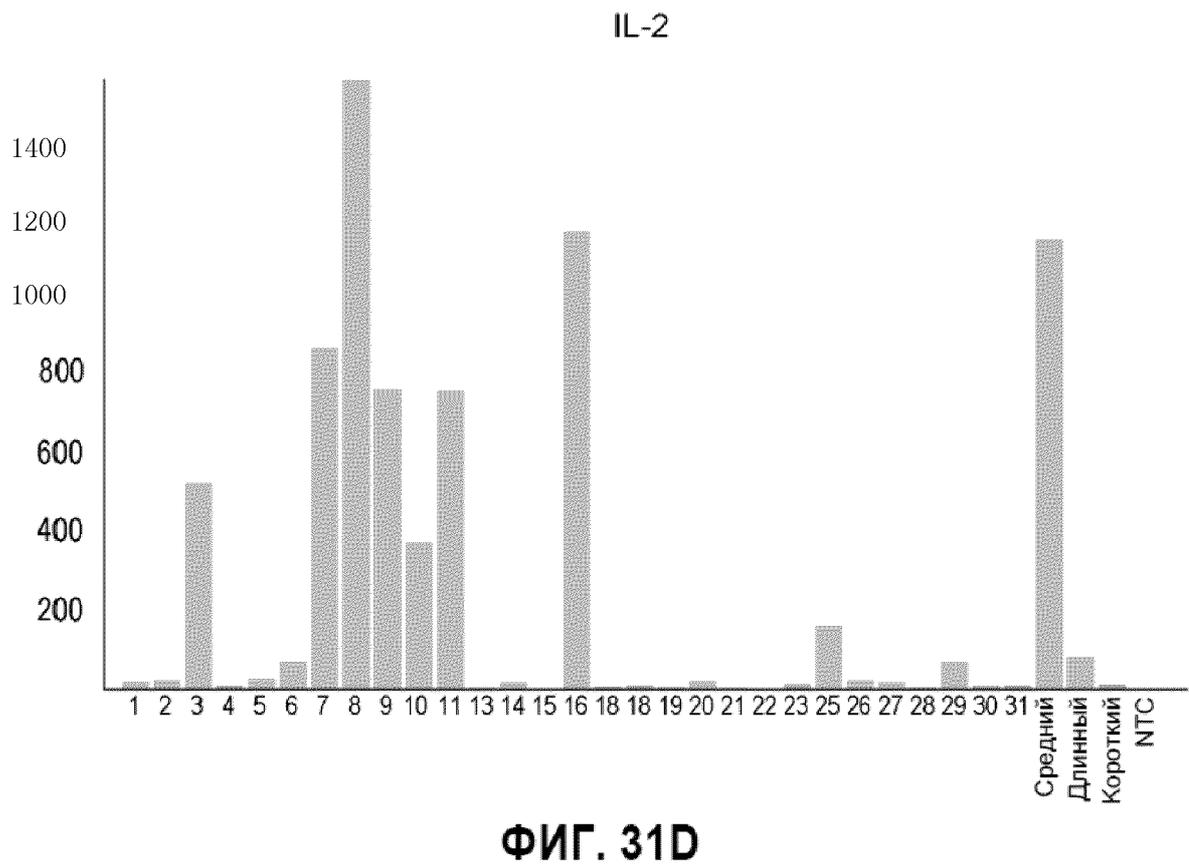
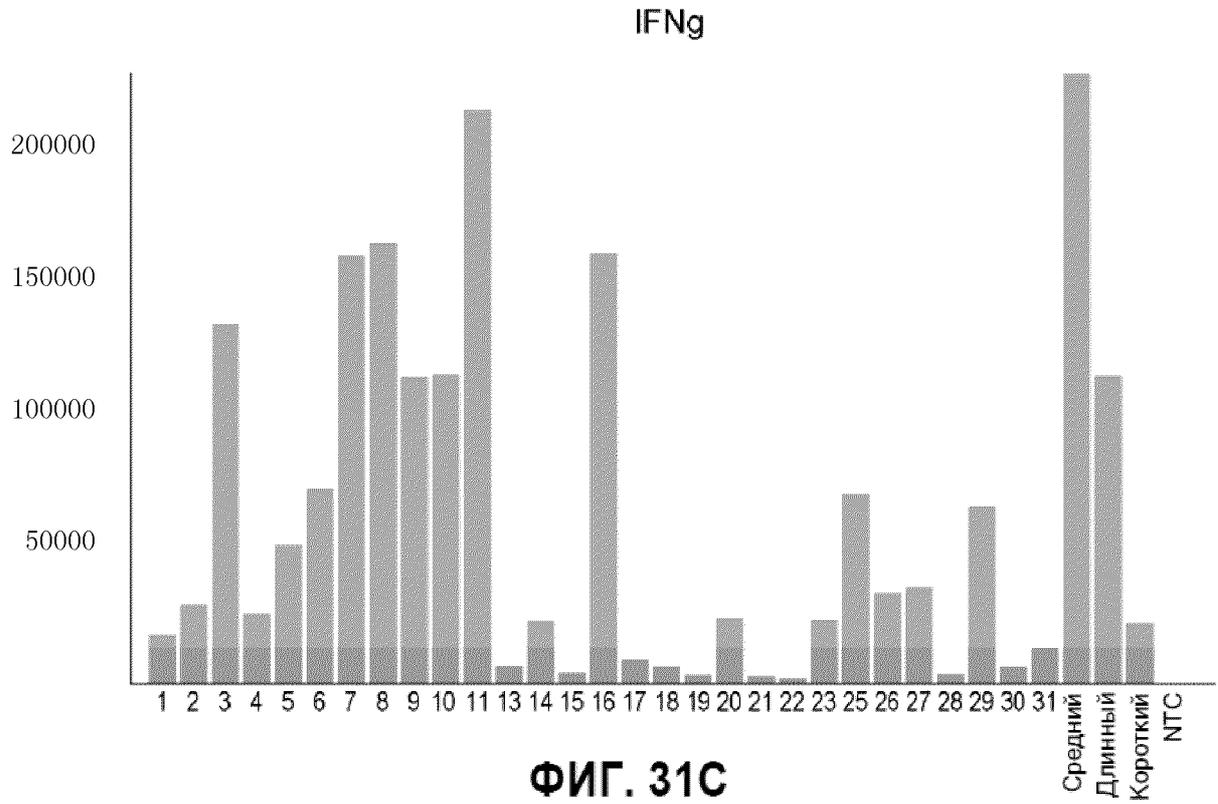
ФИГ. 31А



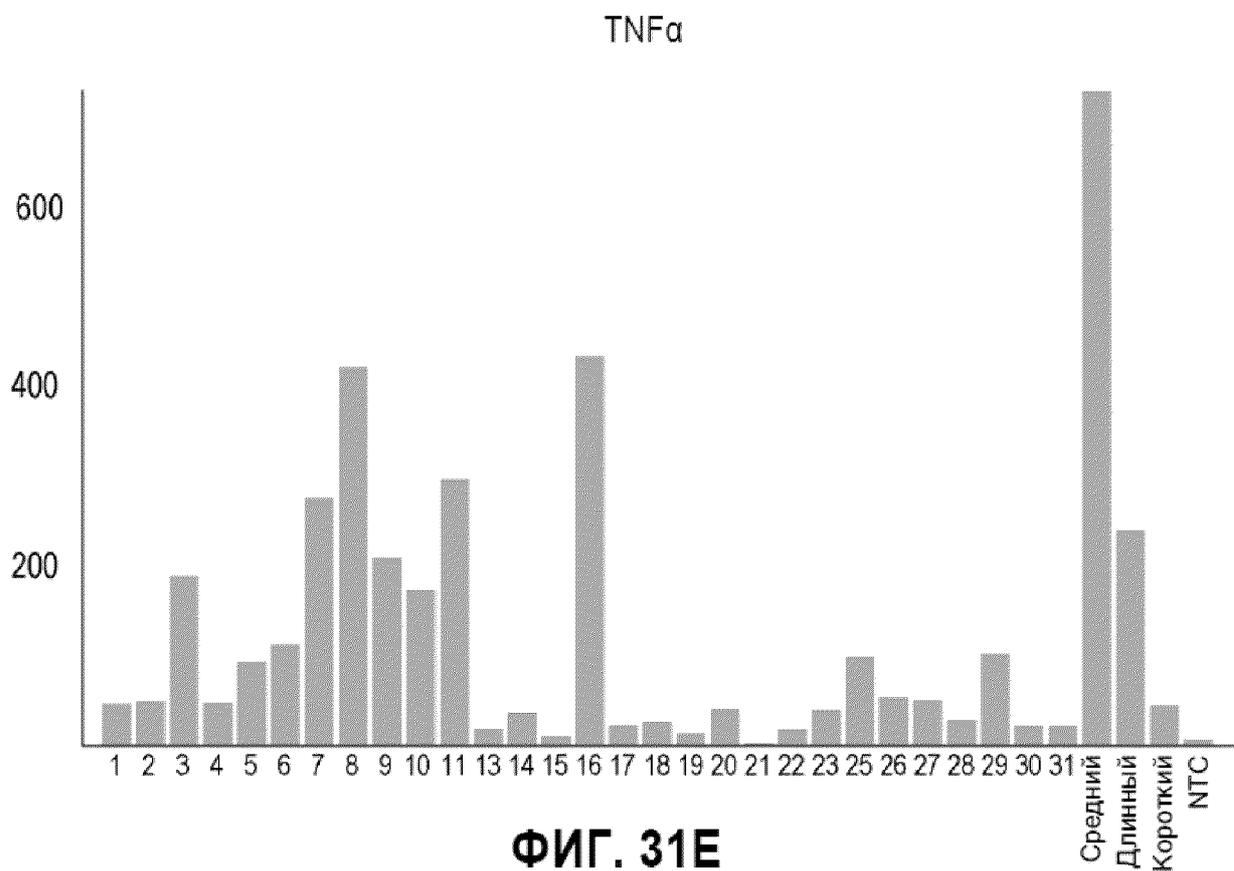
ФИГ. 31В

58/149

Первичное уничтожение и AUC CAR-T D15842: T47D-NLR 1:1

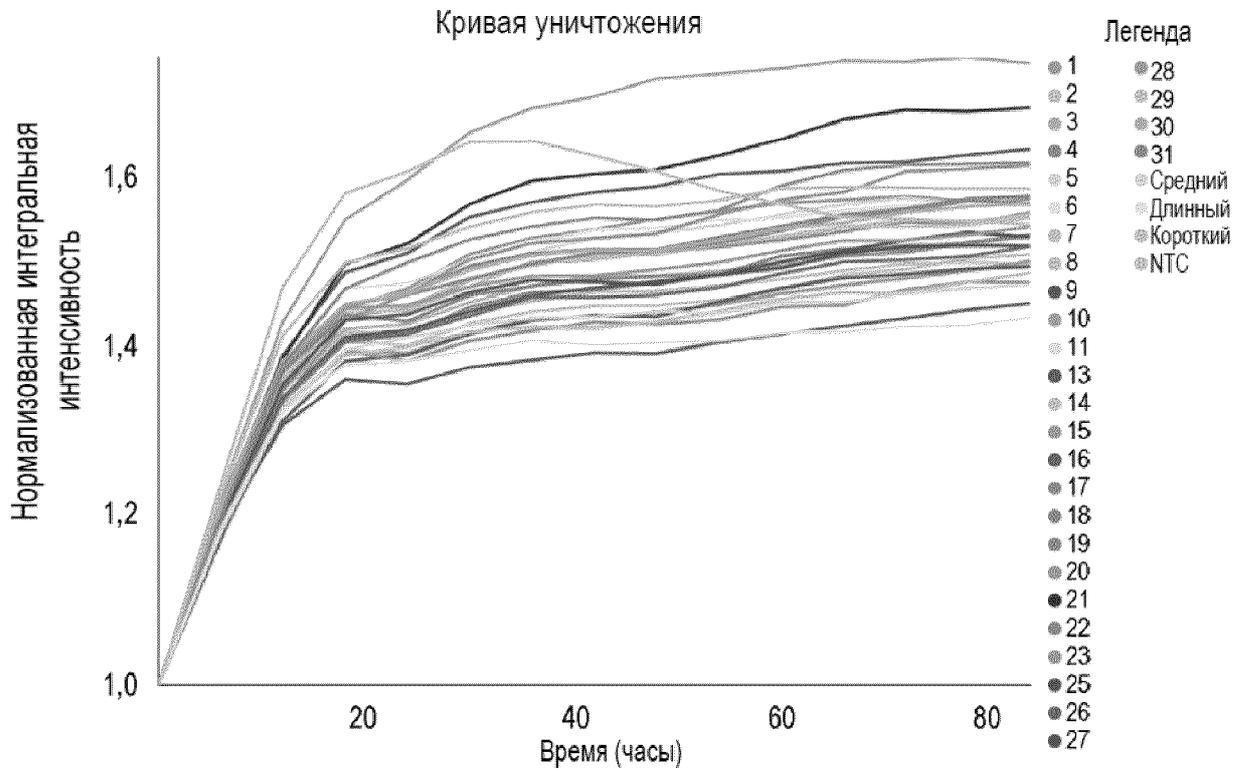


Первичное уничтожение и AUC CAR-T D15842: T47D-NLR 1:1

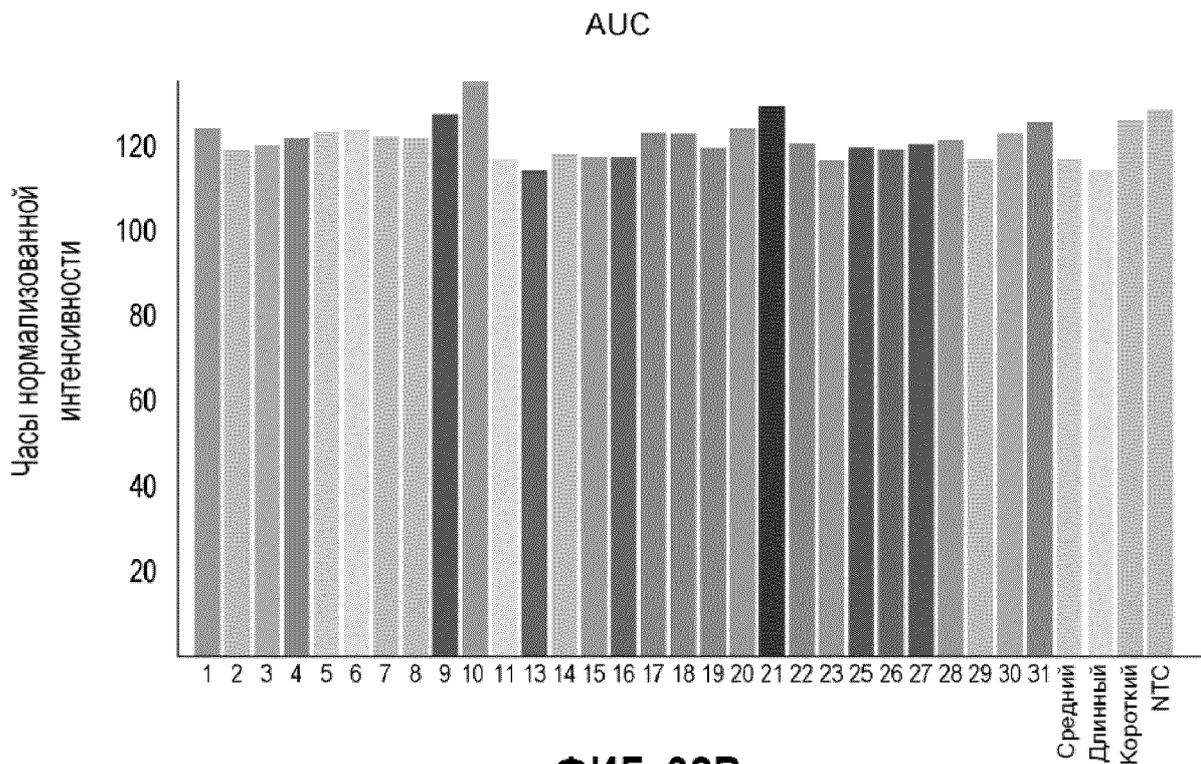


60/149

Первичное уничтожение и AUC CAR-T D13814: T47D-Her2KO-NLR 1:1



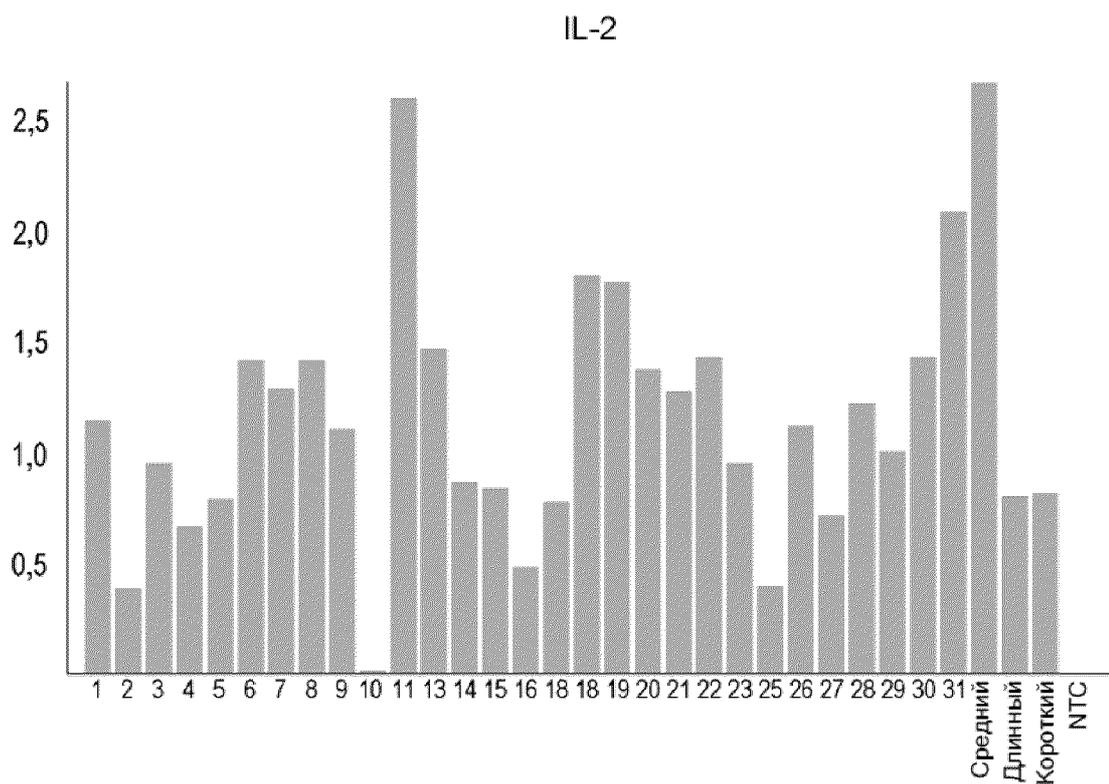
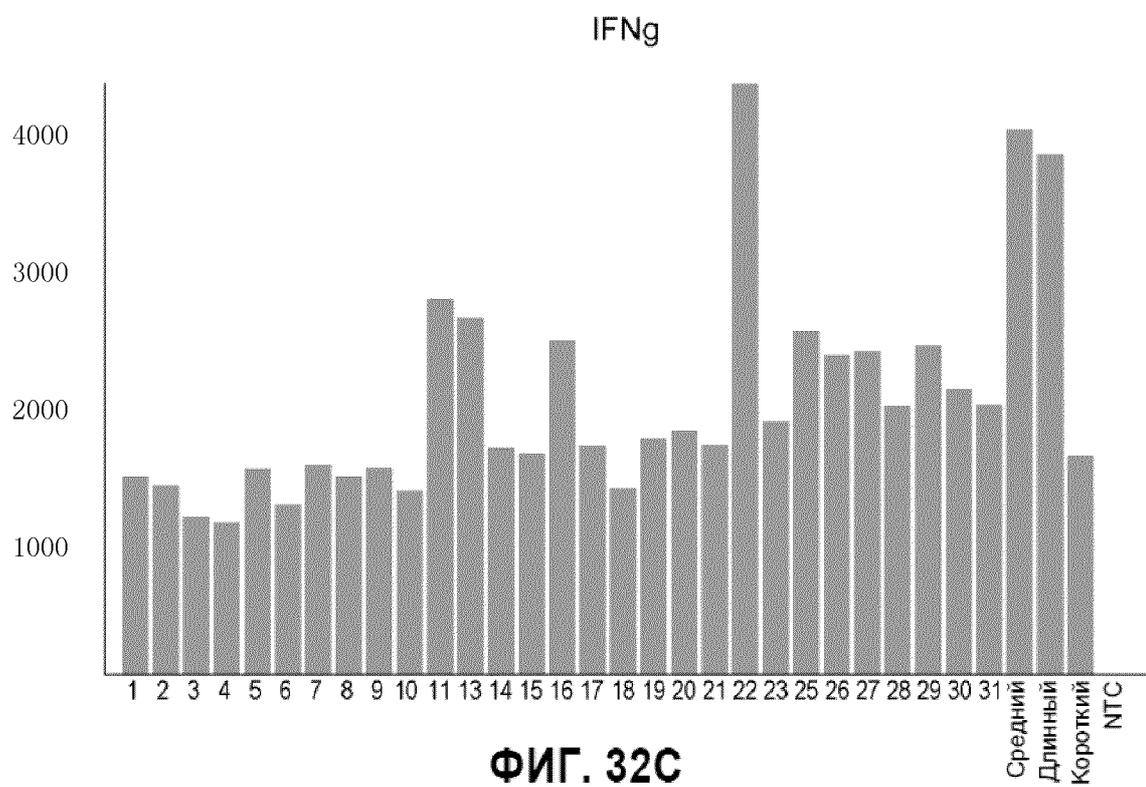
ФИГ. 32А



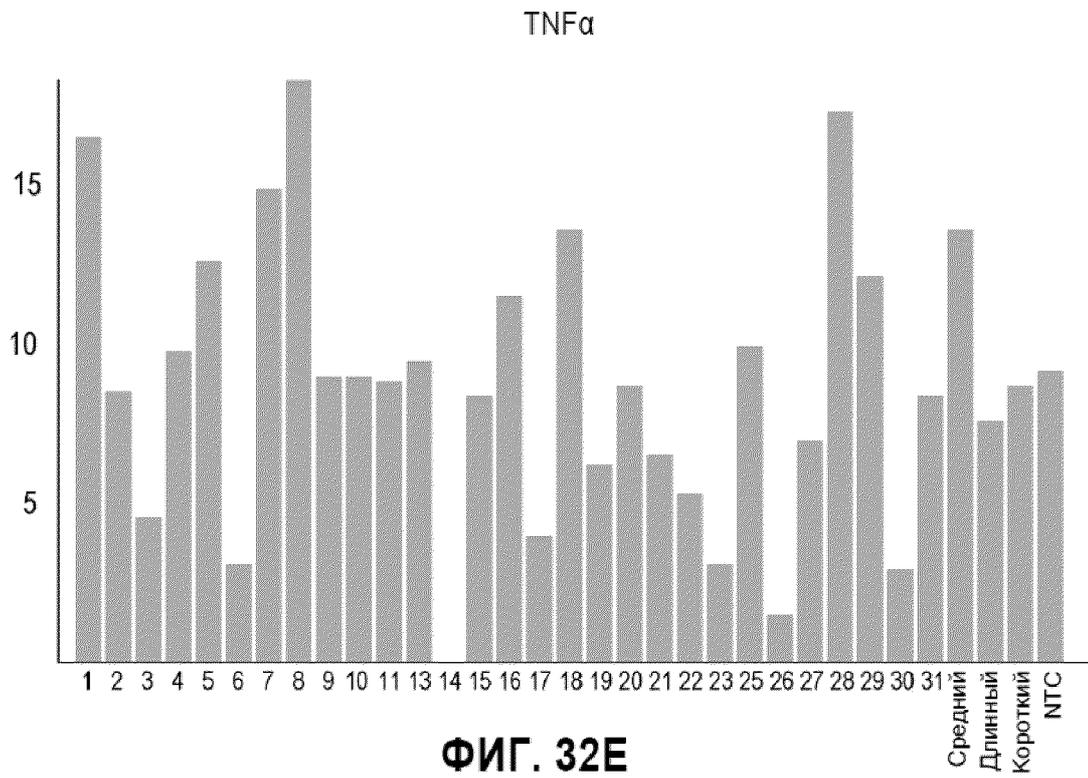
ФИГ. 32В

61/149

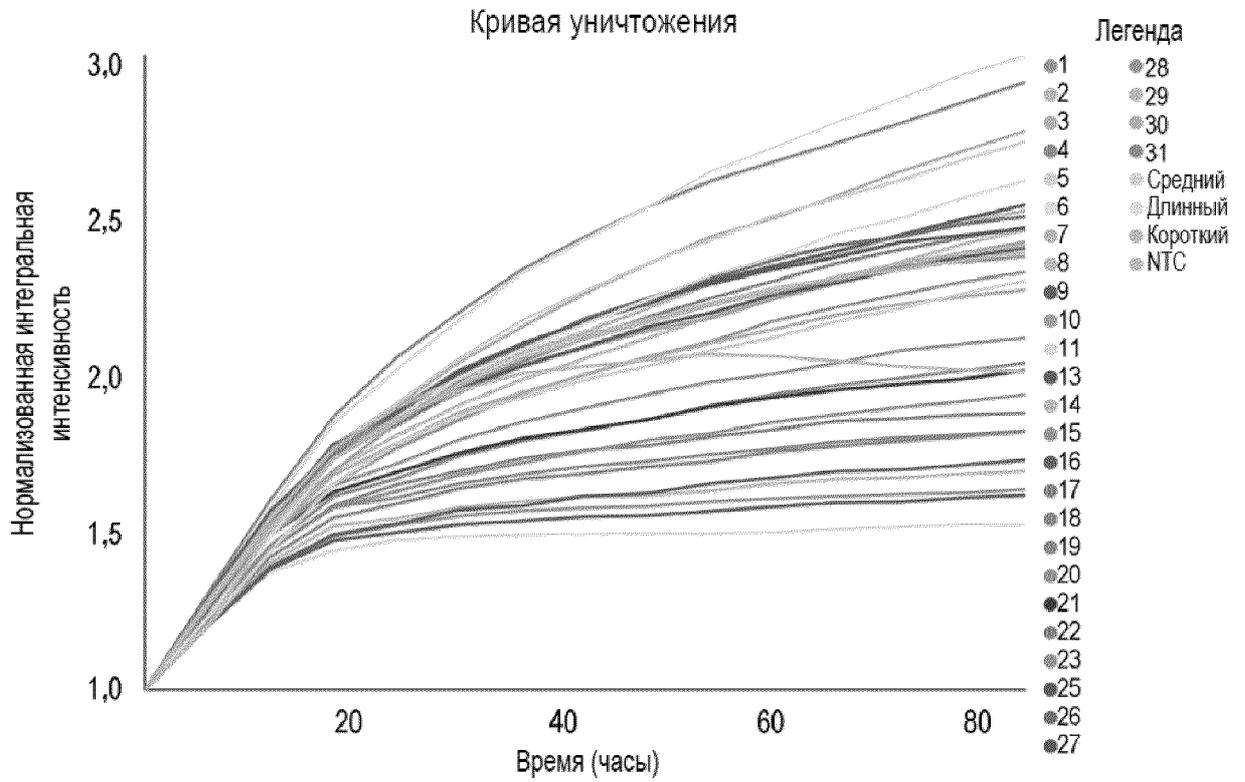
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D13814: T47D-Her2KO-NLR 1:1



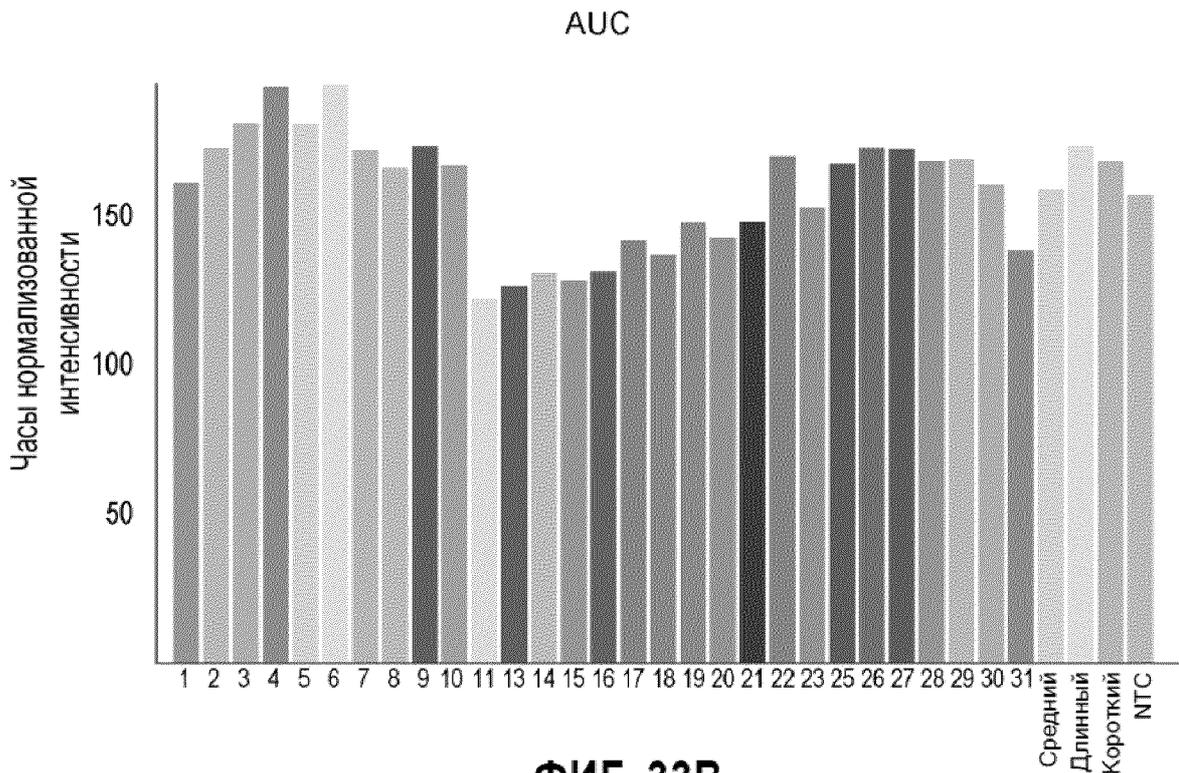
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D13814: T47D-Her2KO-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D15842: T47D-Her2KO-NLR 1:1

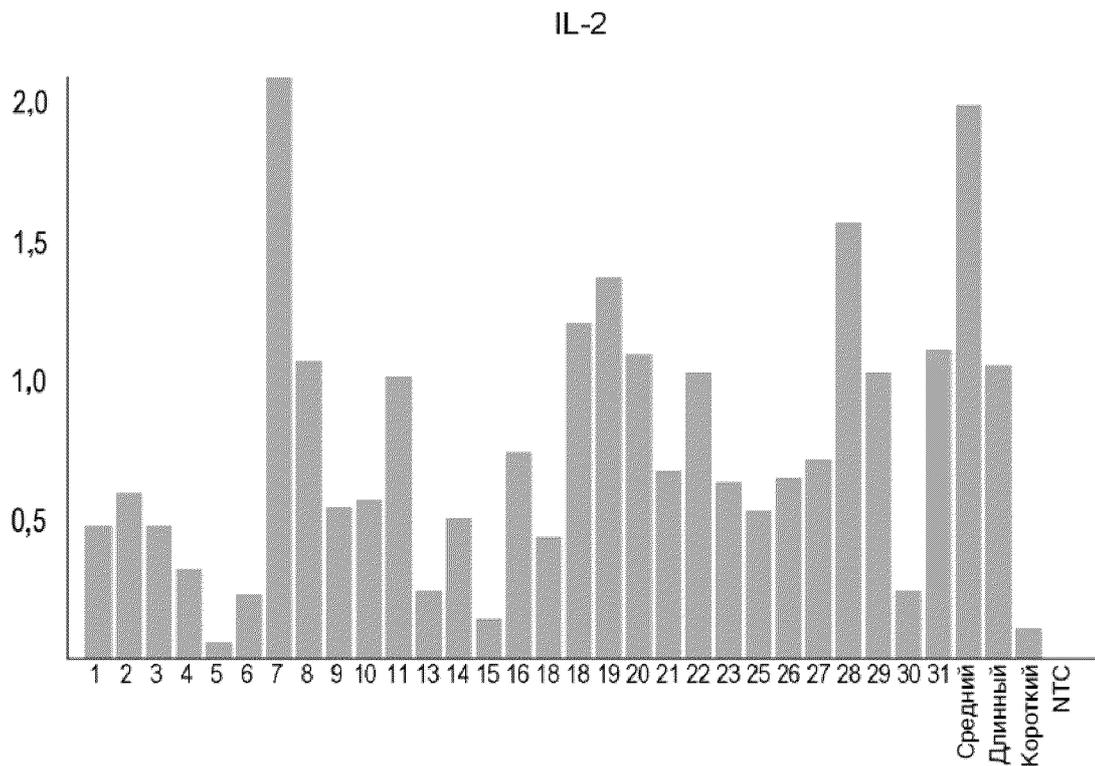
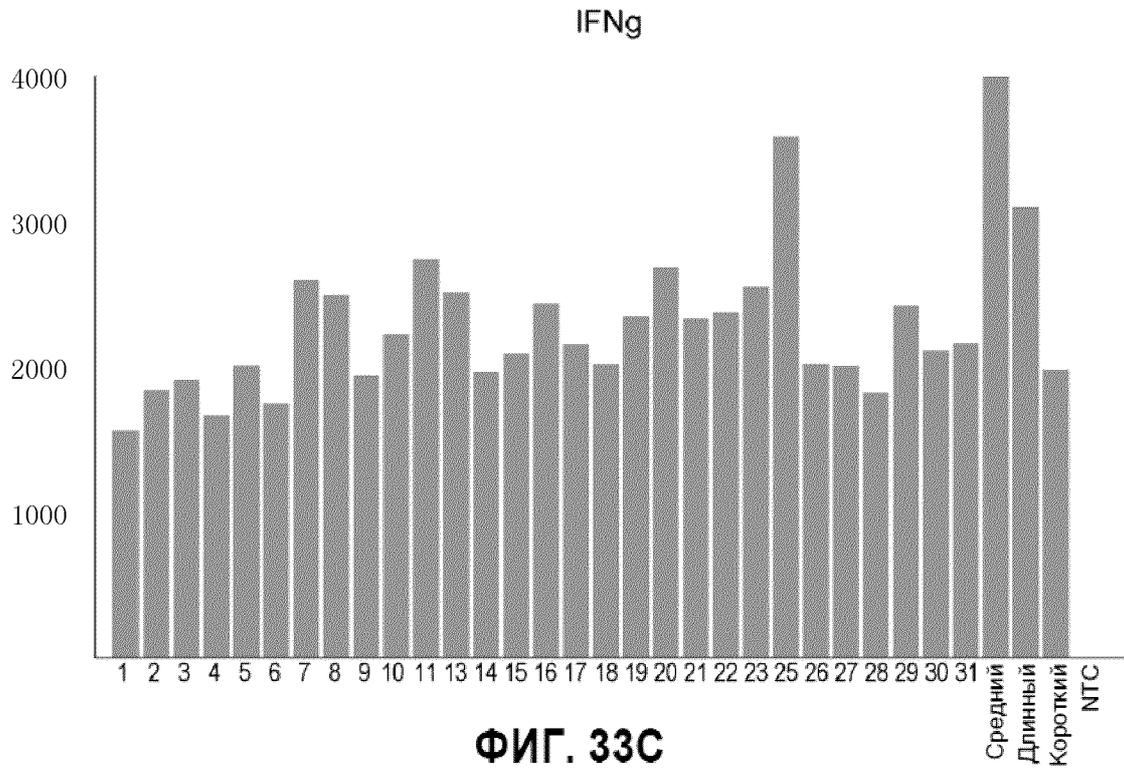


ФИГ. 33А

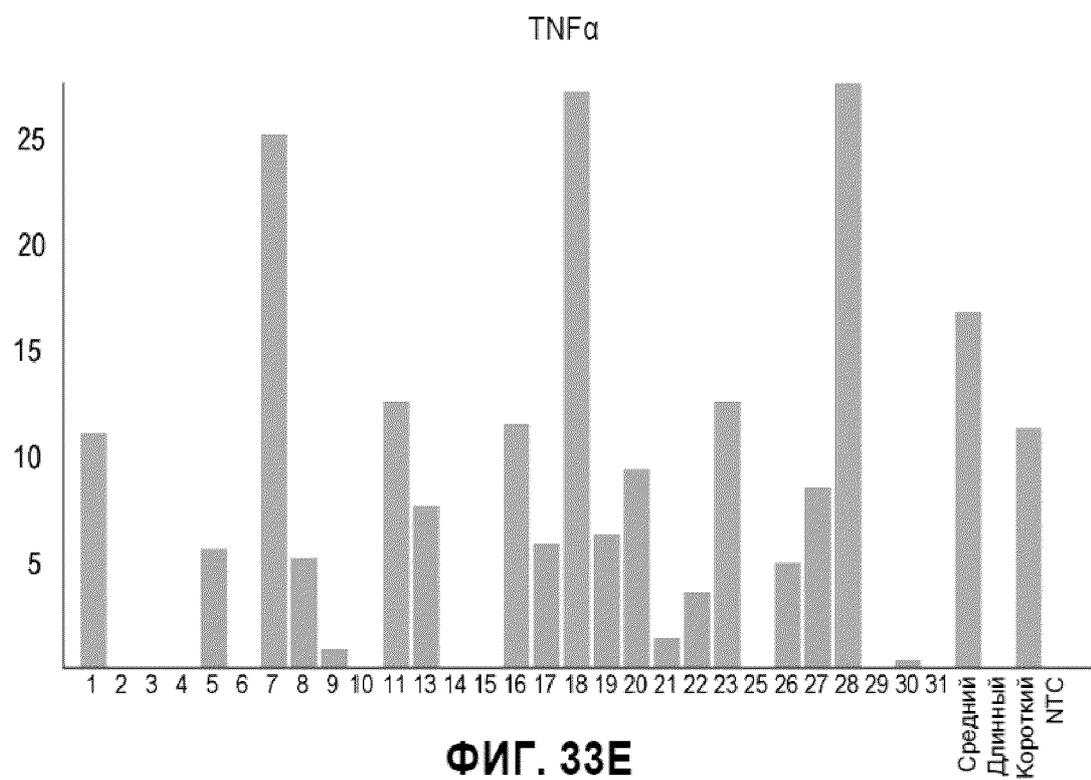


ФИГ. 33В

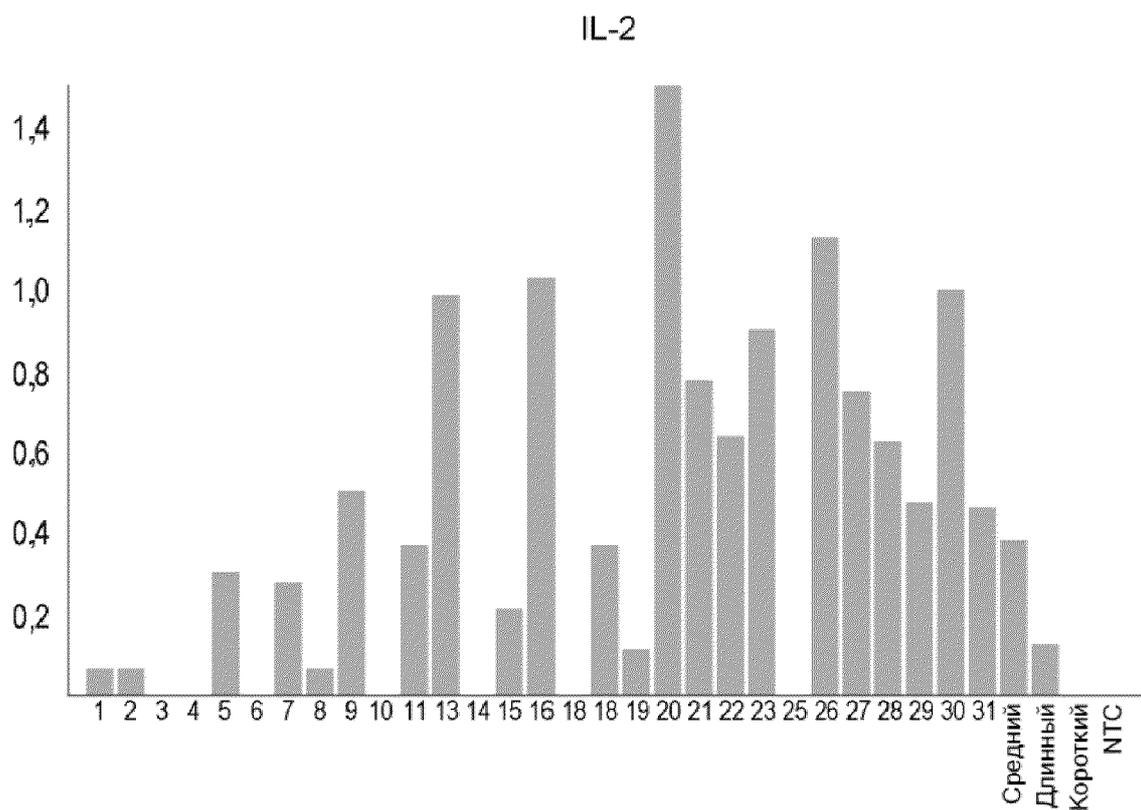
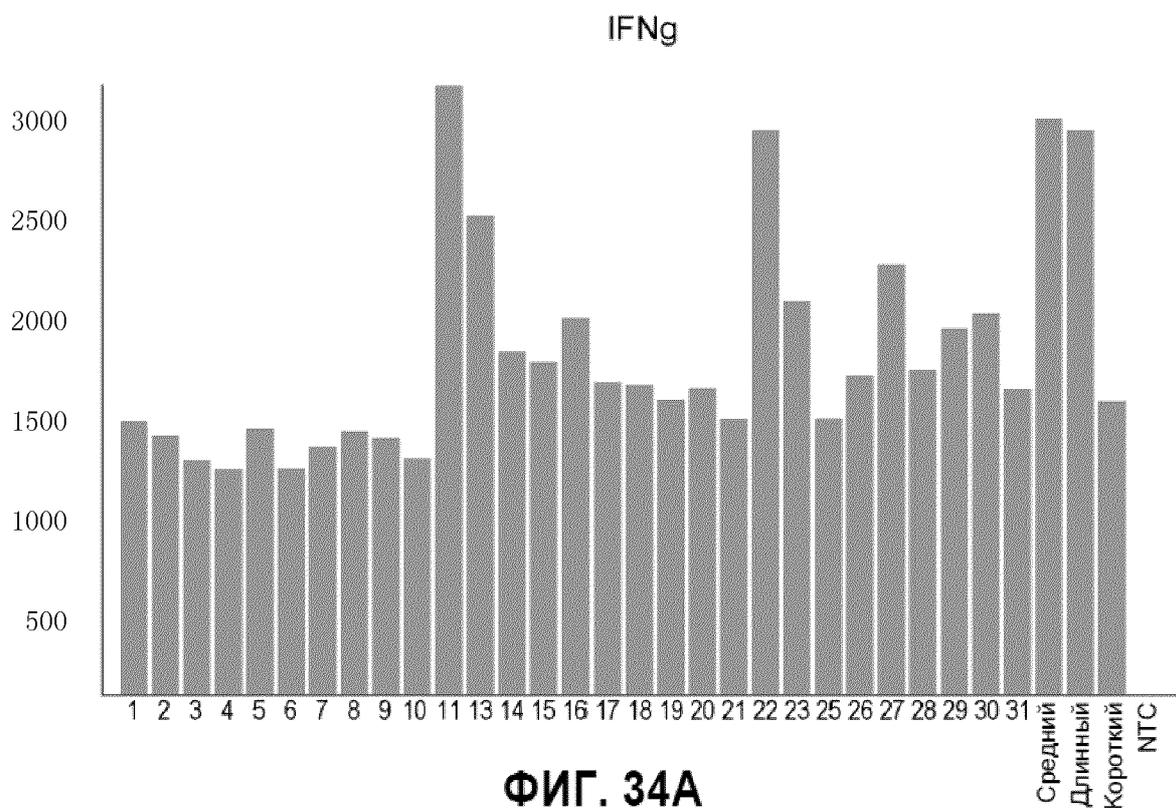
Первичное уничтожение и AUC CAR-T D15842: T47D-Her2KO-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC CAR-T D15842: T47D-Her2KO-NLR 1:1

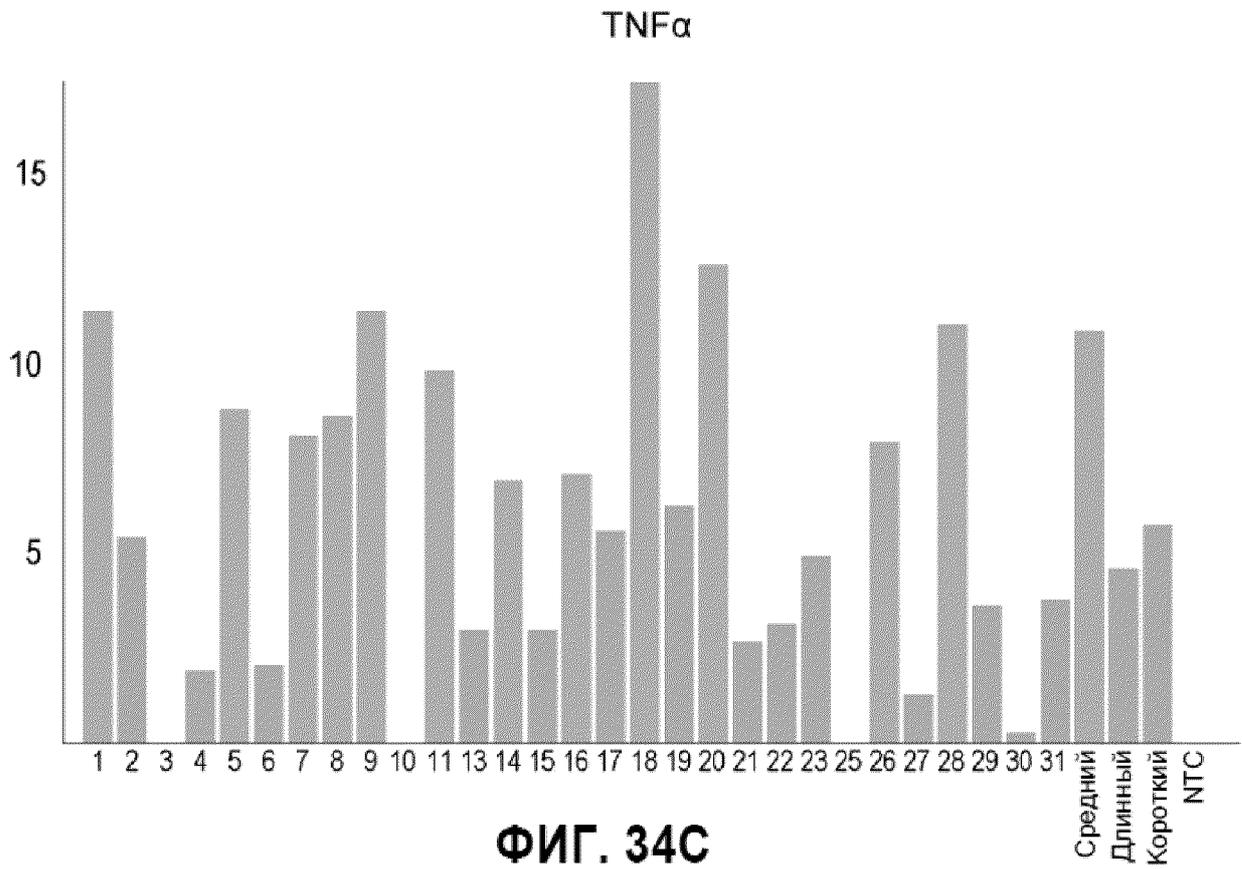


66/149
Независимые от мишени цитокины D13814



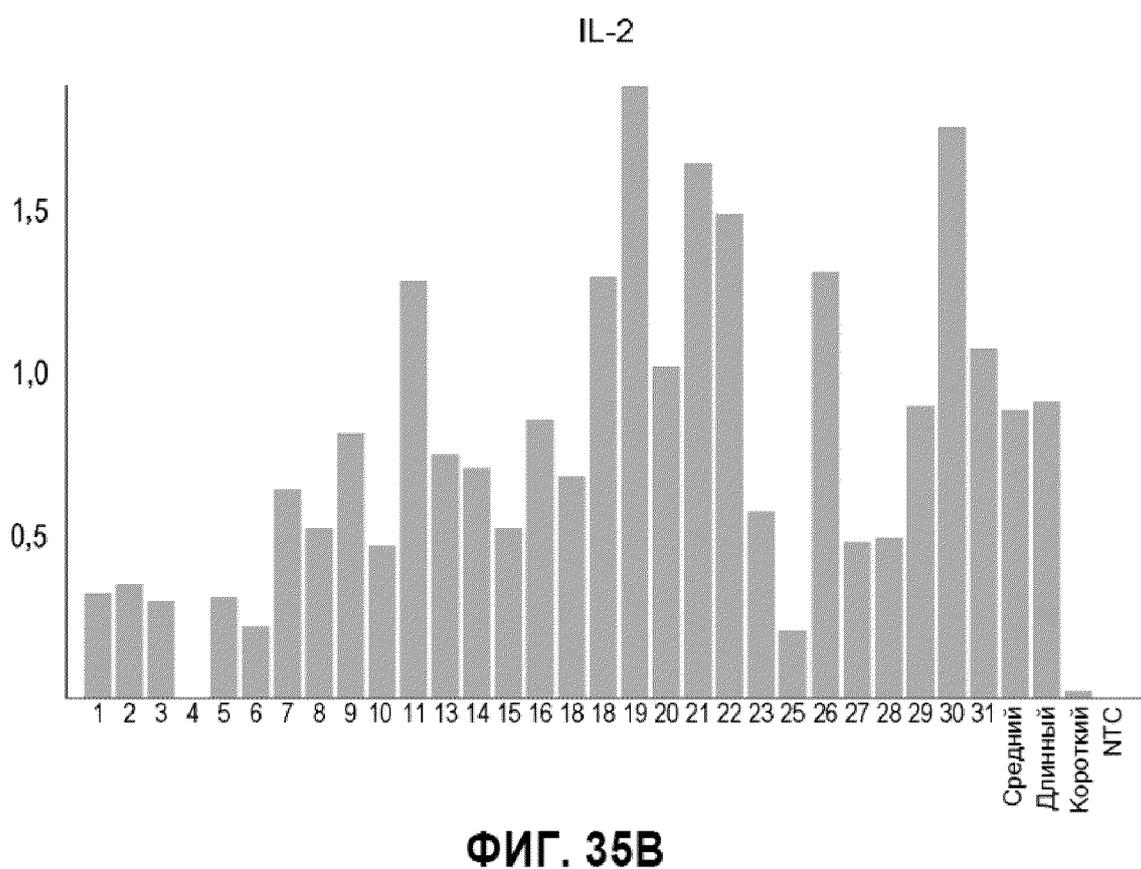
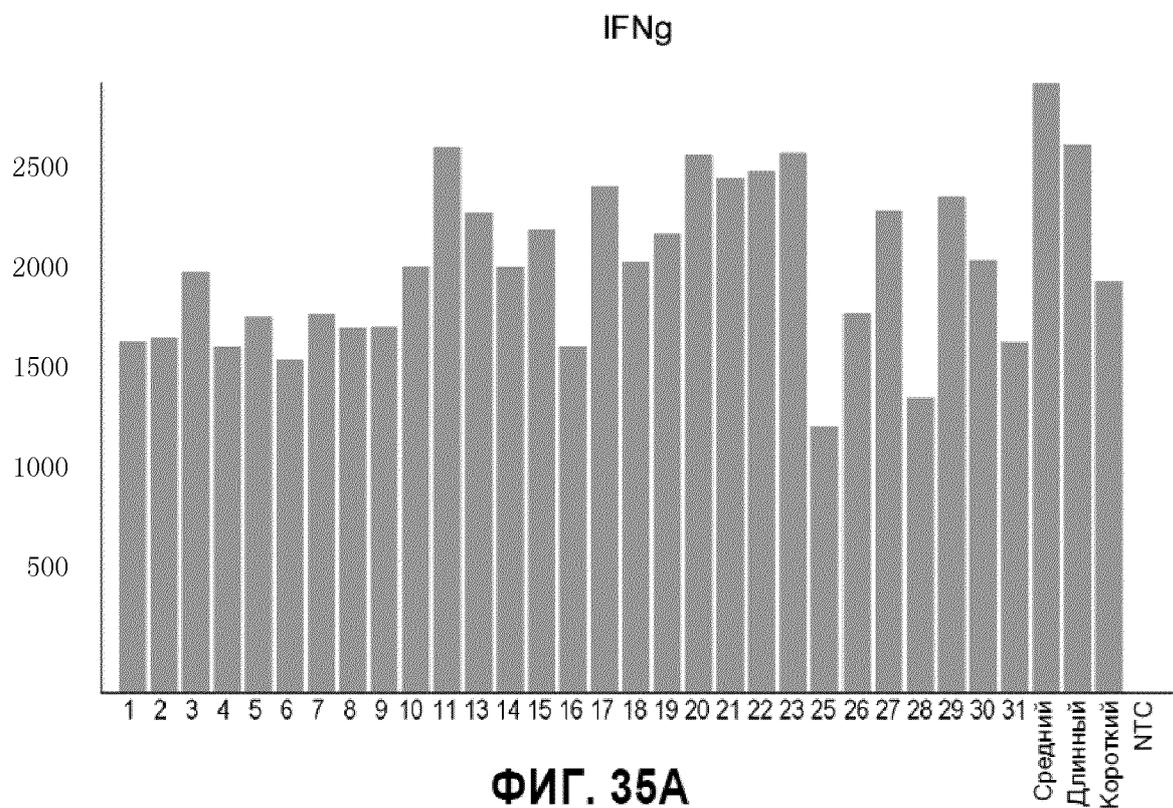
67/149

Независимые от мишени цитокины D13814

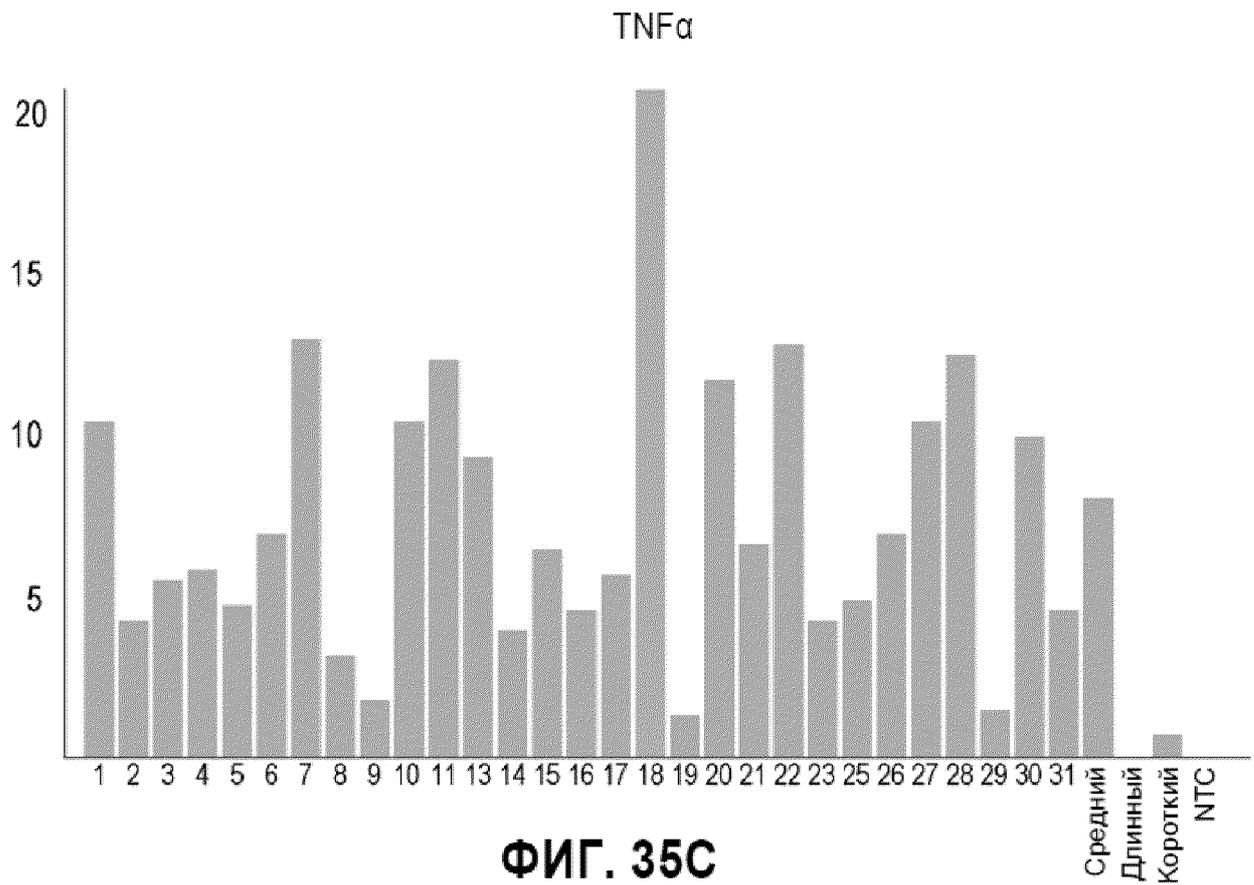


68/149

Независимые от мишени цитокины D15842



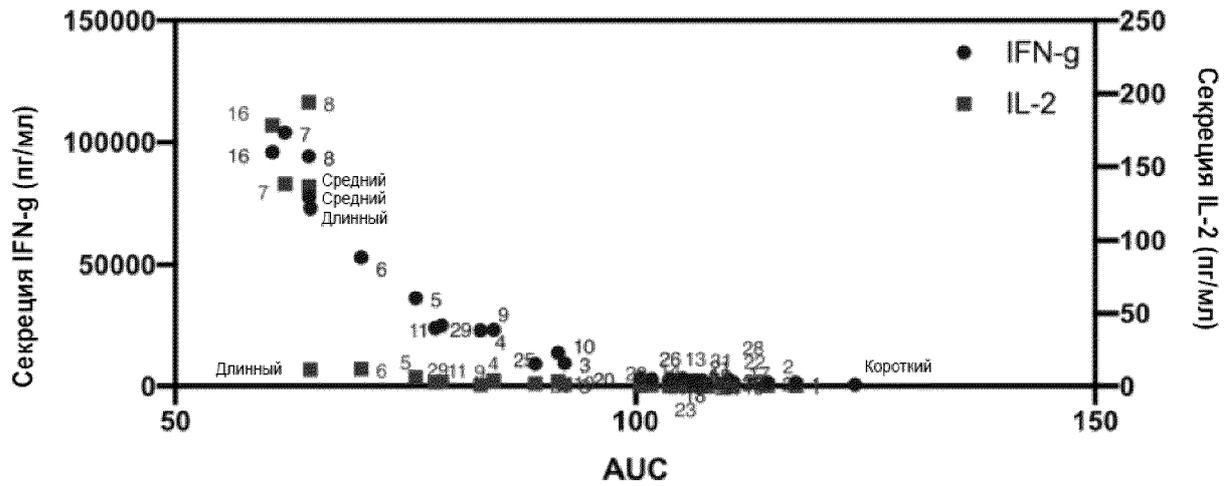
Независимые от мишени цитокины D15842



70/149

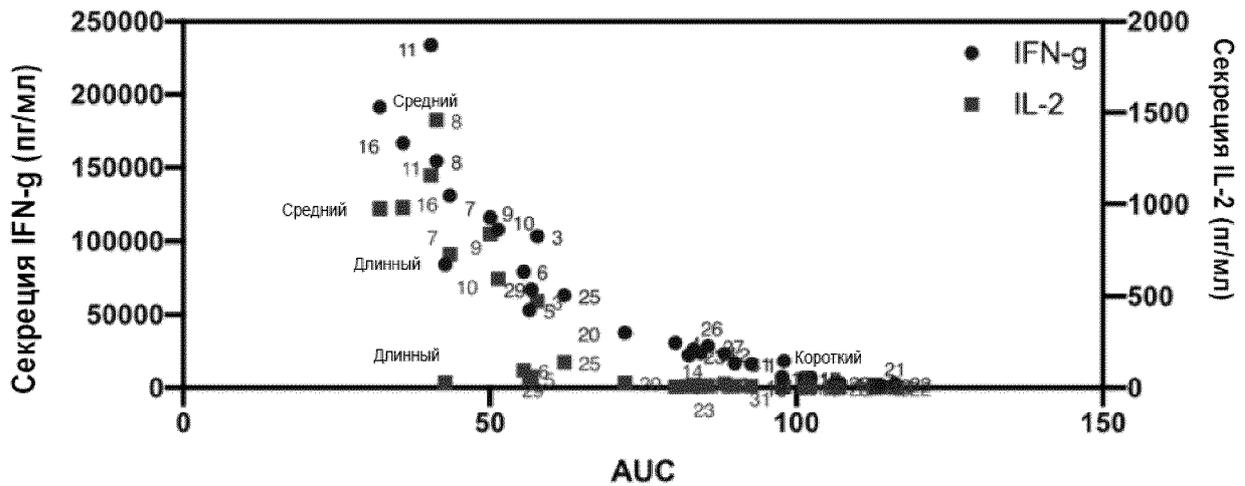
Цитокин и AUC

CAR-T к Her2 13814: A549 1:1 AUC и Цитокины



ФИГ. 36А

CAR-T к Her2 13814: A47D 1:1 AUC и Цитокины

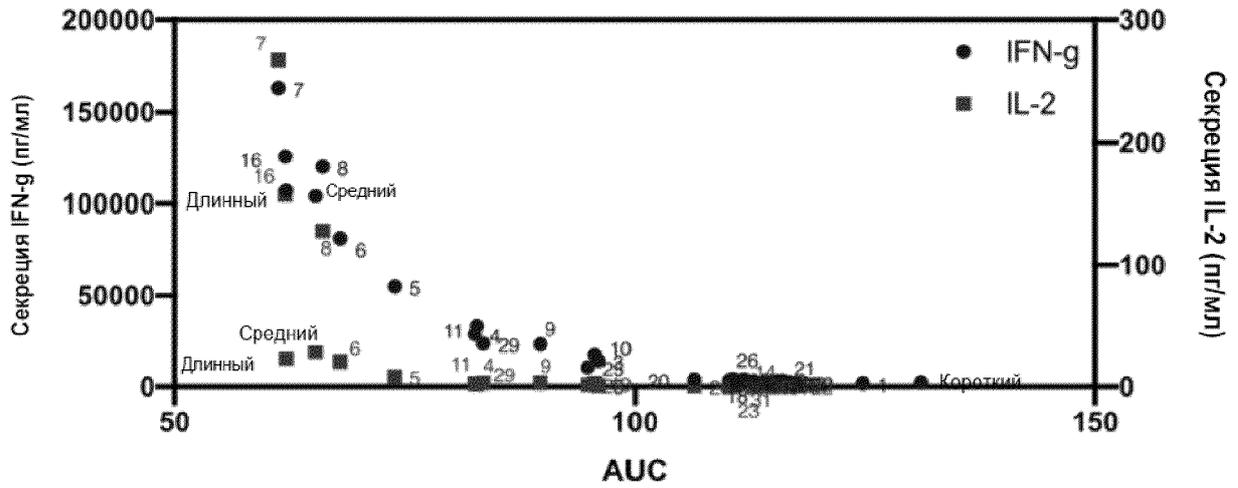


ФИГ. 36В

71/149

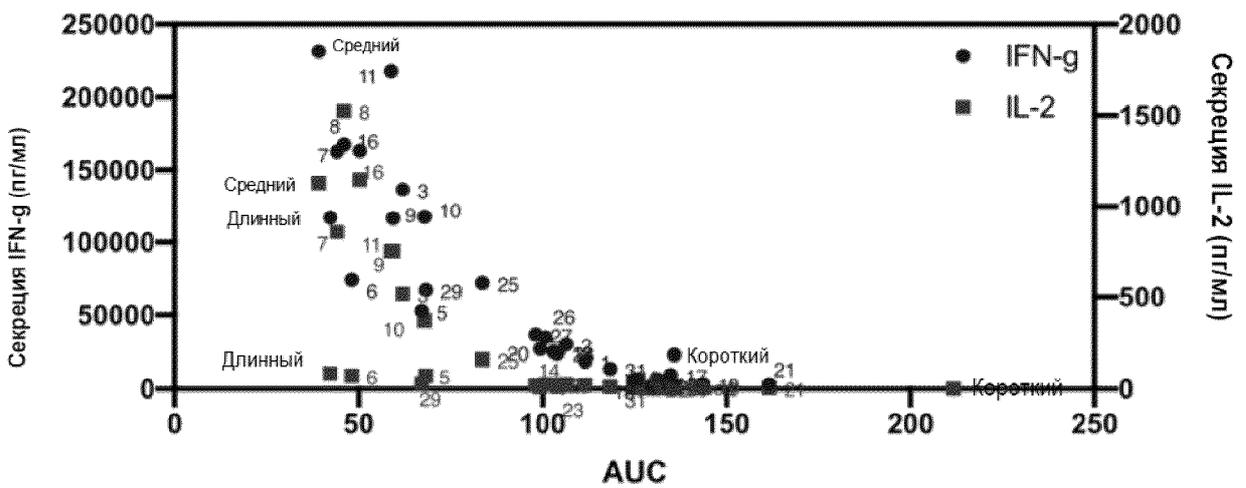
Цитокин и AUC

CAR-T к Her2 15842: A549 1:1 AUC и Цитокины



ФИГ. 36С

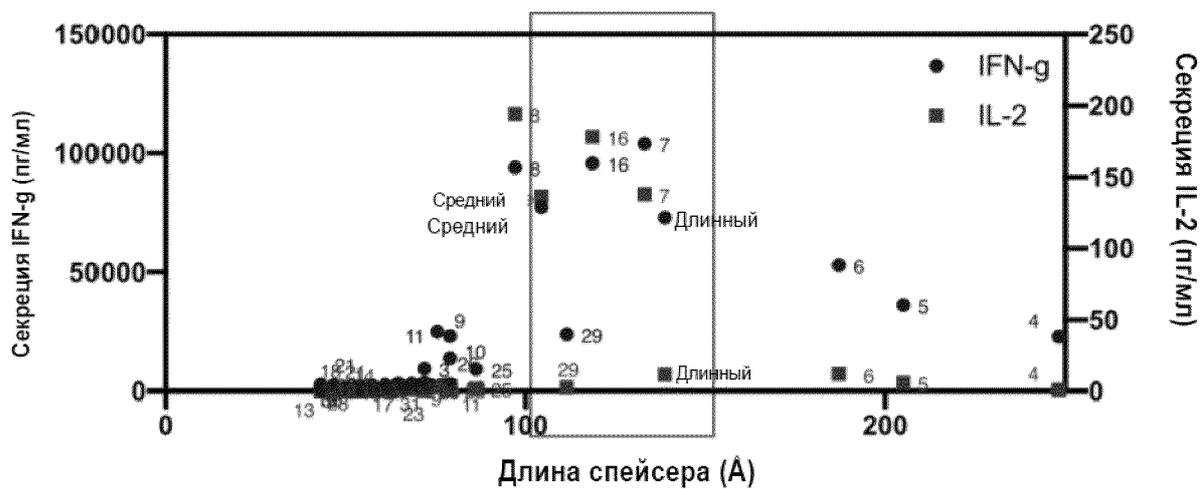
CAR-T к Her2 15842: A47D 1:1 AUC и Цитокины



ФИГ. 36D

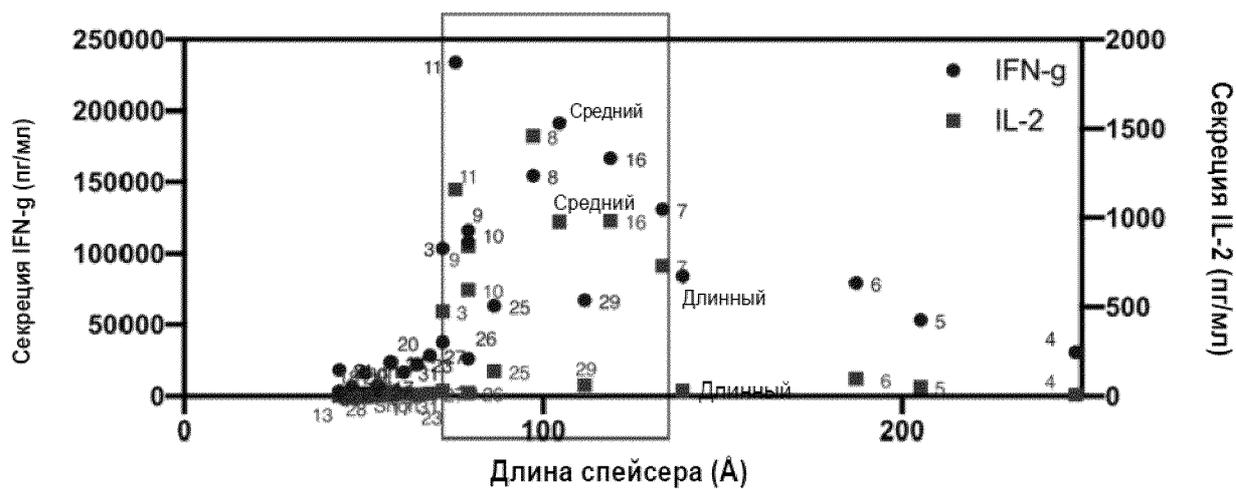
Цитокин и длина спейсера

CAR-T к Her2 13814: A549 1:1 Длина спейсера и Цитокины



ФИГ. 37А

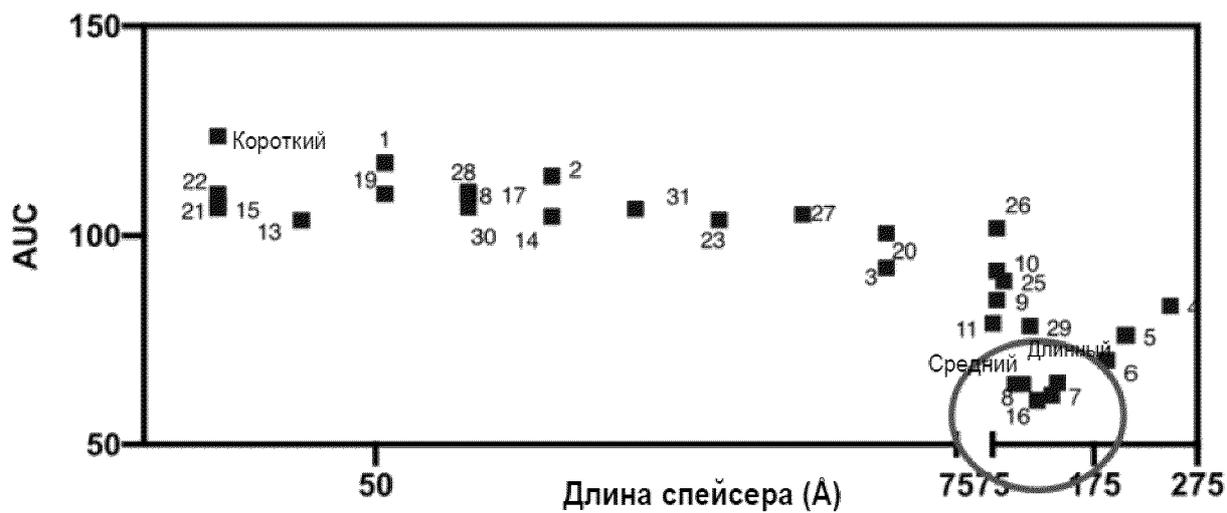
CAR-T к Her2 13814: A47D 1:1 Длина спейсера и Цитокины



ФИГ. 37В

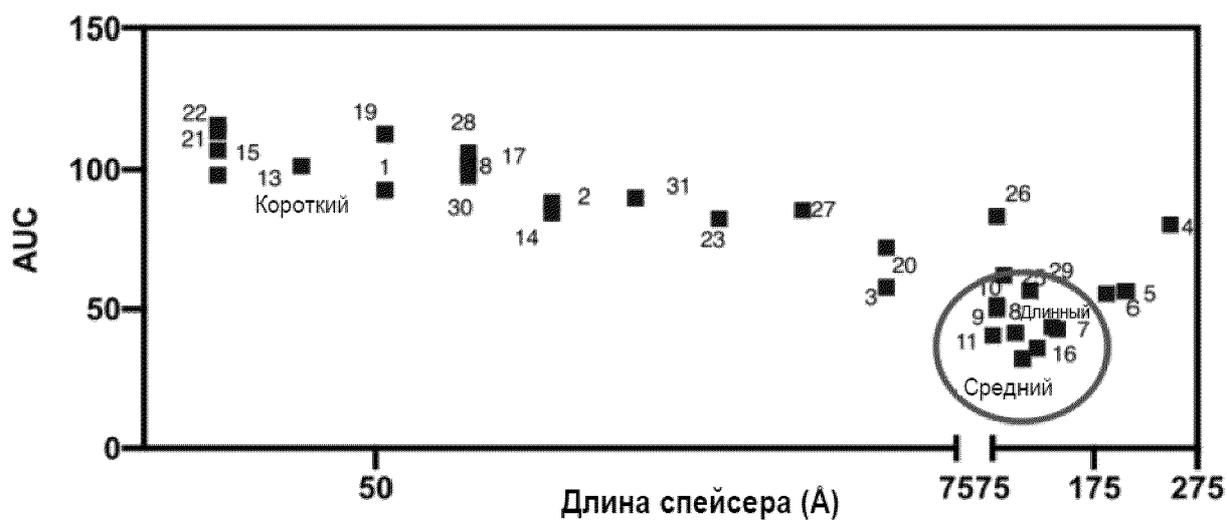
Длина спейсера и AUC

CAR-T к Her2 13814: A549 1:1 AUC и Длина спейсера



ФИГ. 38А

CAR-T к Her2 13814: A47D 1:1 AUC и Длина спейсера

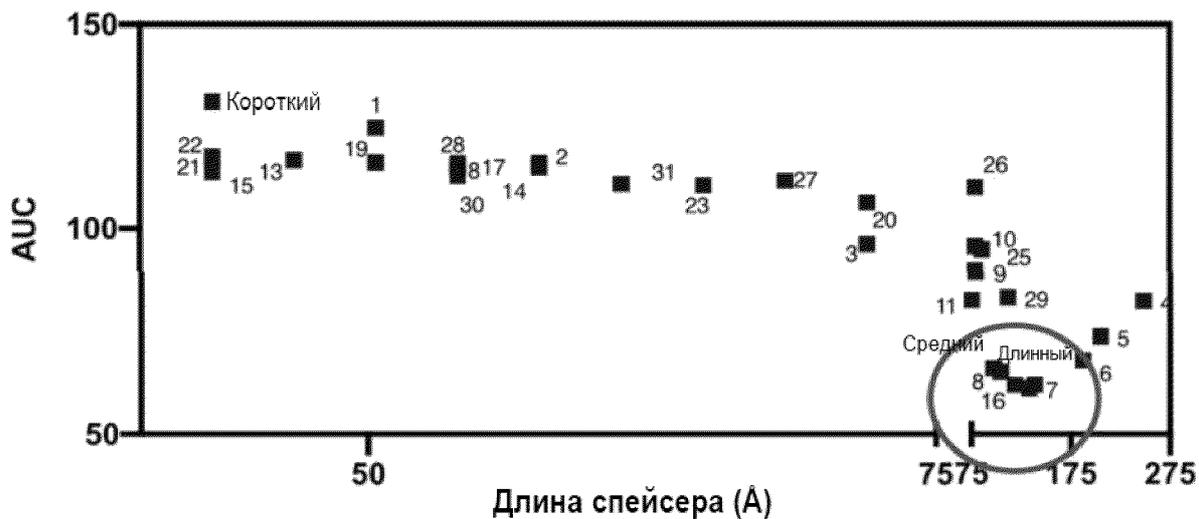


ФИГ. 38В

75/149

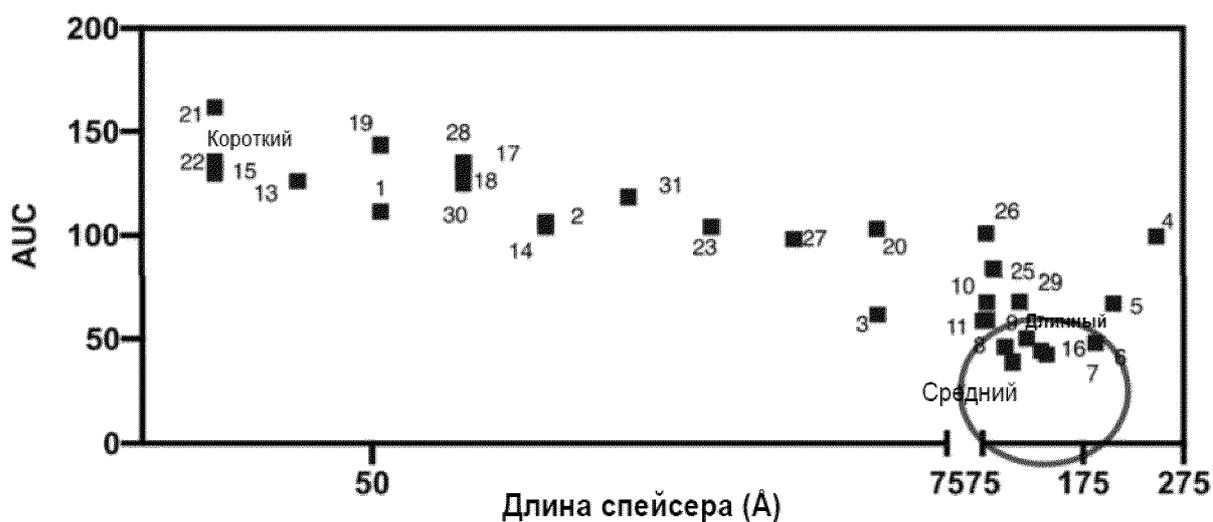
Длина спейсера и AUC

CAR-T к Her2 13814: A549 1:1 AUC и Длина спейсера



ФИГ. 38С

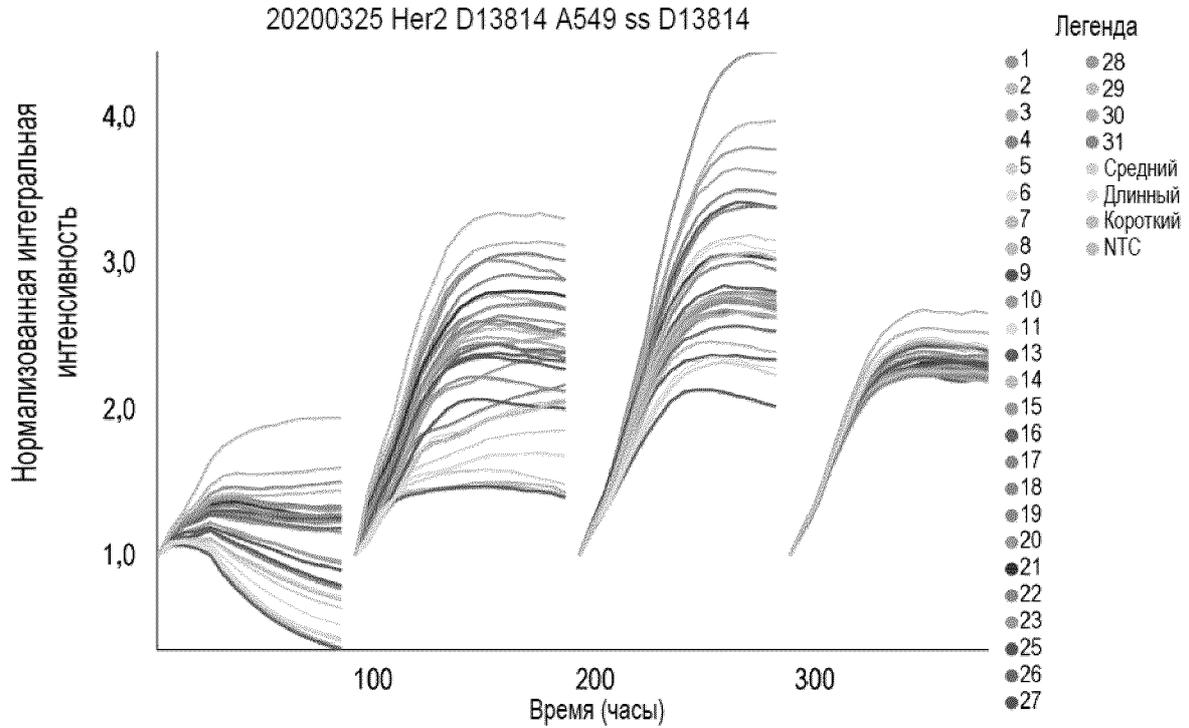
CAR-T к Her2 15842: A47D 1:1 AUC и Длина спейсера



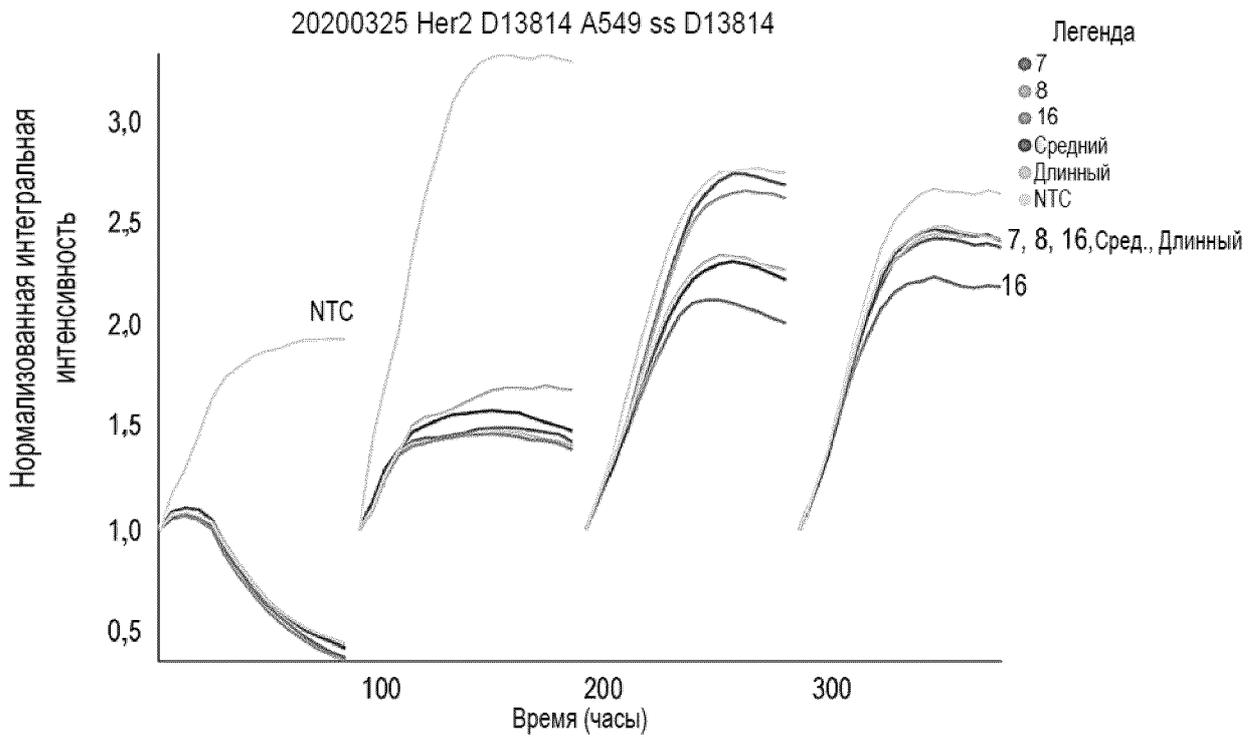
ФИГ. 38D

76/149

Последовательное уничтожение
Донор 13814



ФИГ. 39А

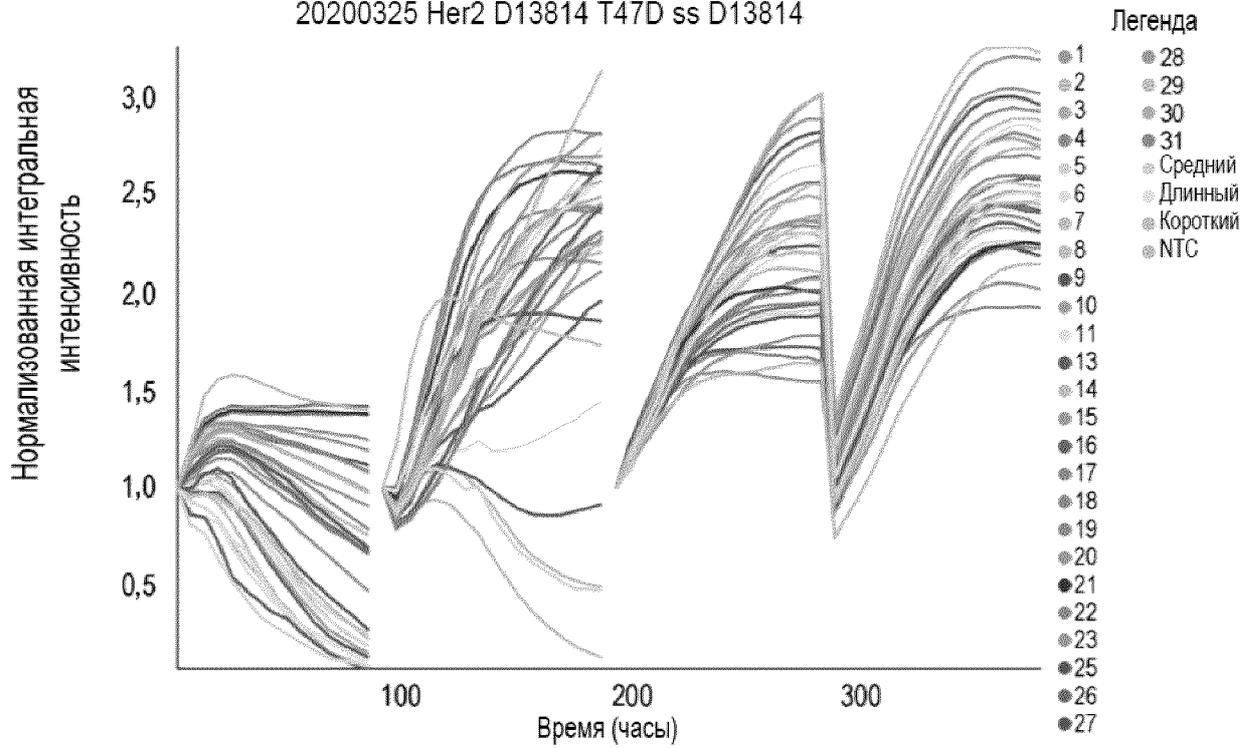


ФИГ. 39В

77/149

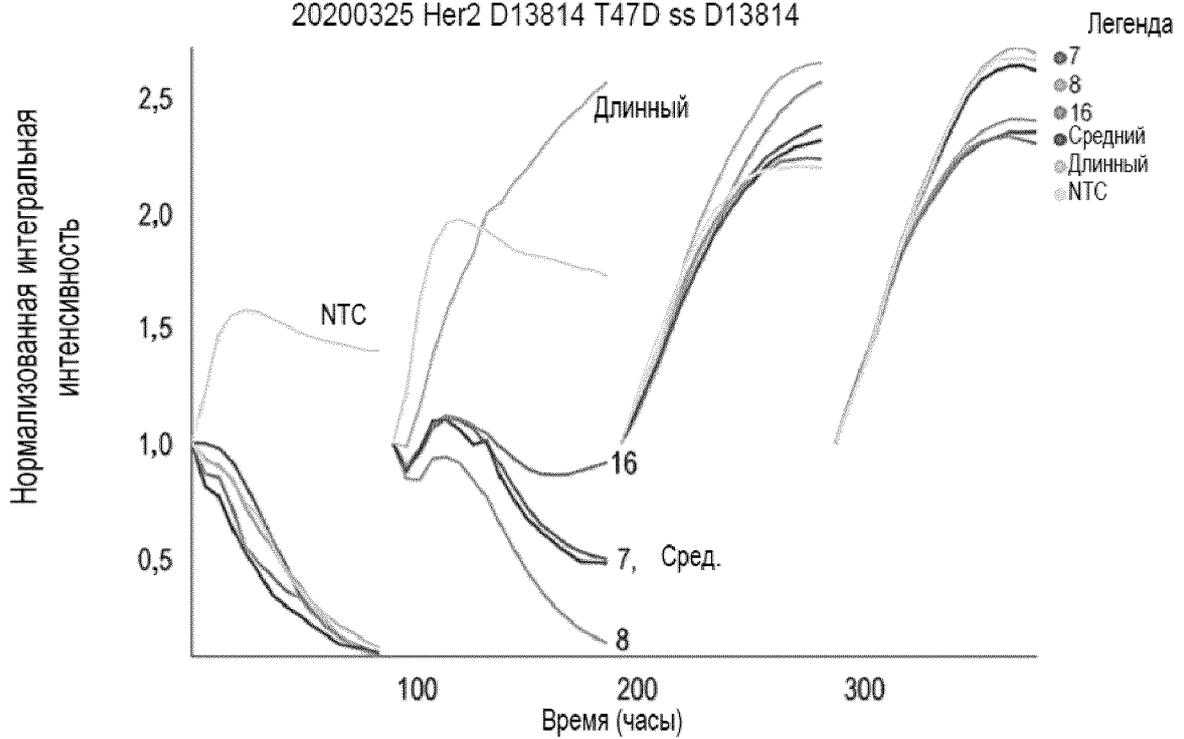
Последовательное
уничтожение Донор 13814

20200325 Her2 D13814 T47D ss D13814



ФИГ. 39С

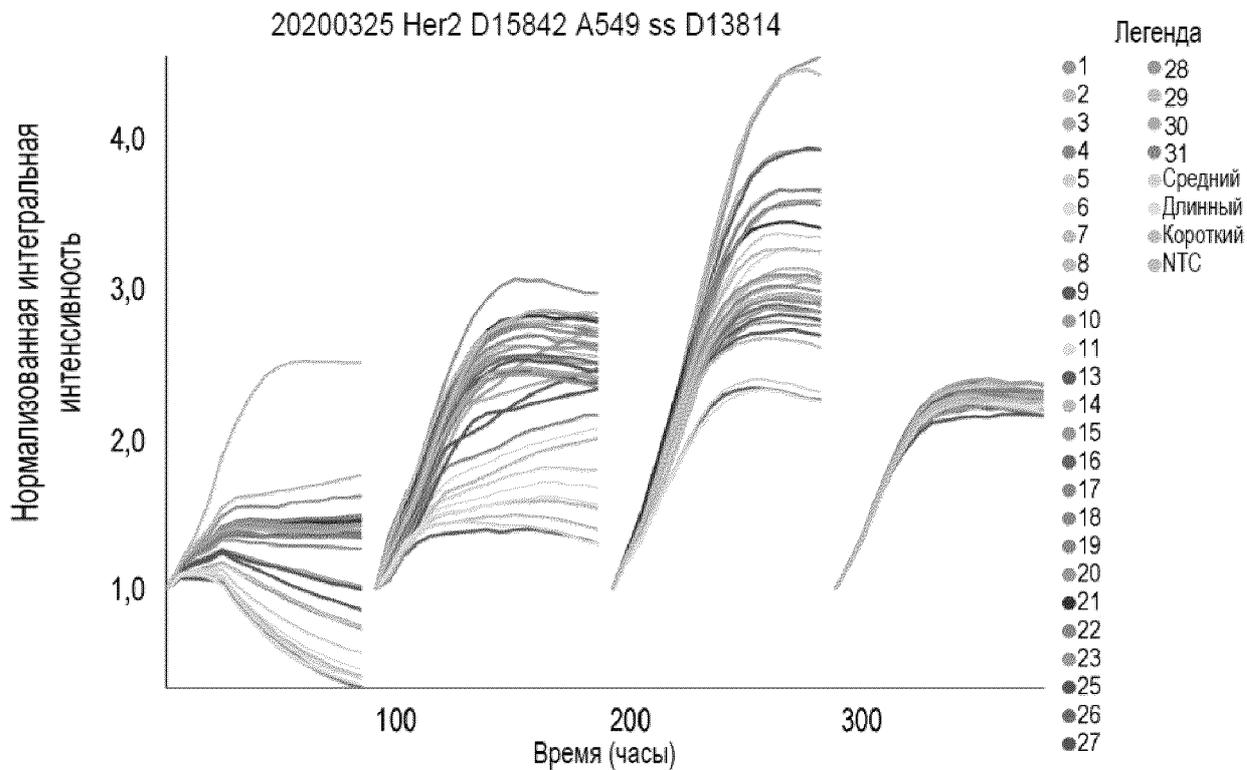
20200325 Her2 D13814 T47D ss D13814



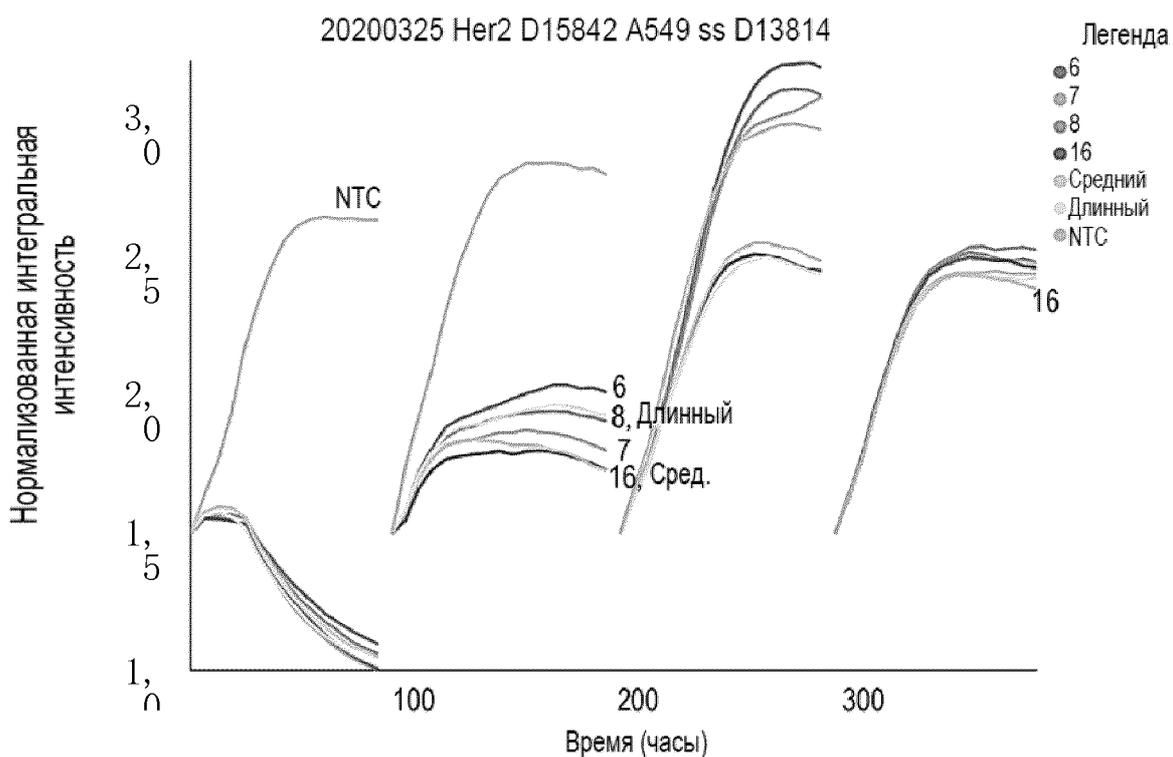
ФИГ. 39D

78/149

Последовательное
уничтожение Донор 15842



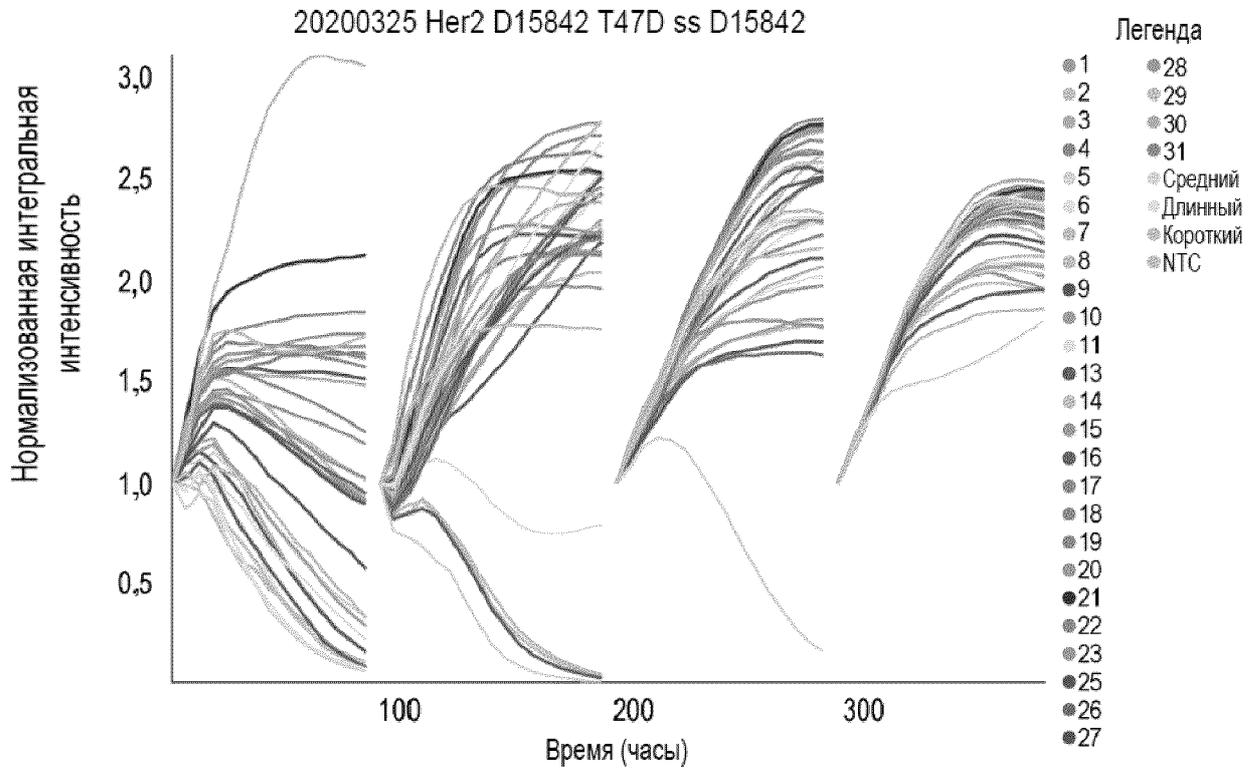
ФИГ. 40А



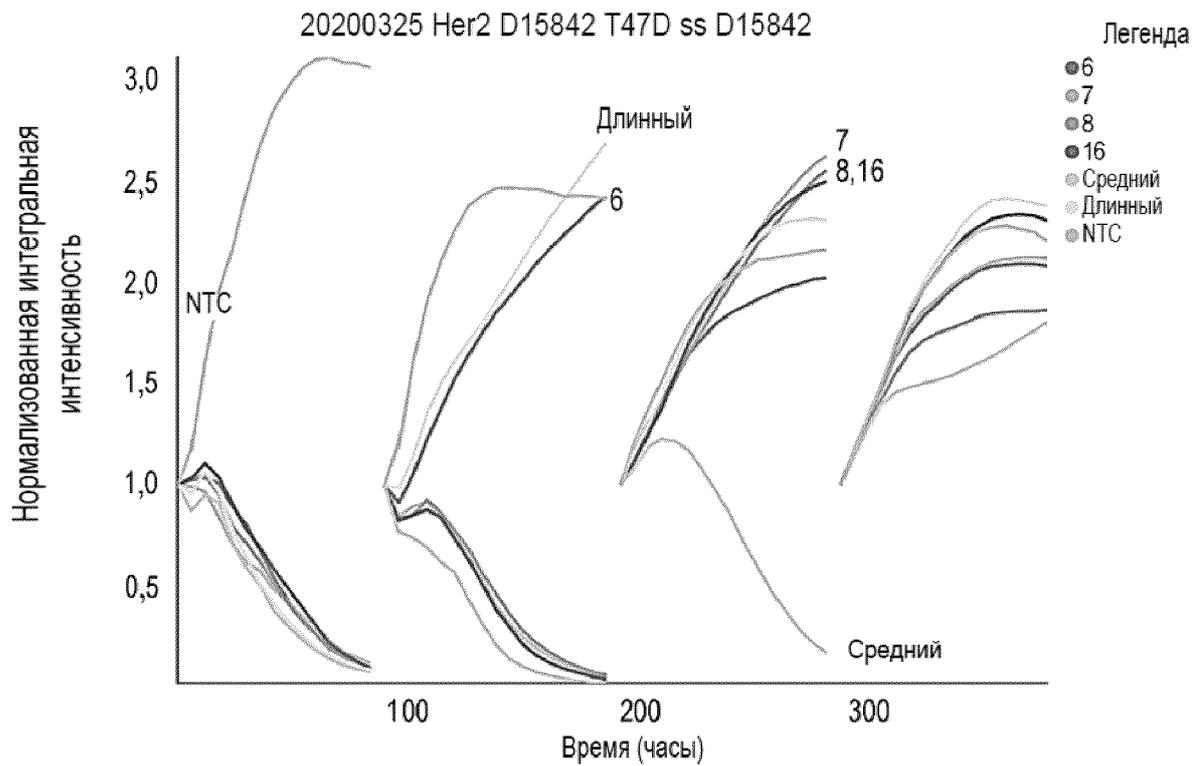
ФИГ. 40В

79/149

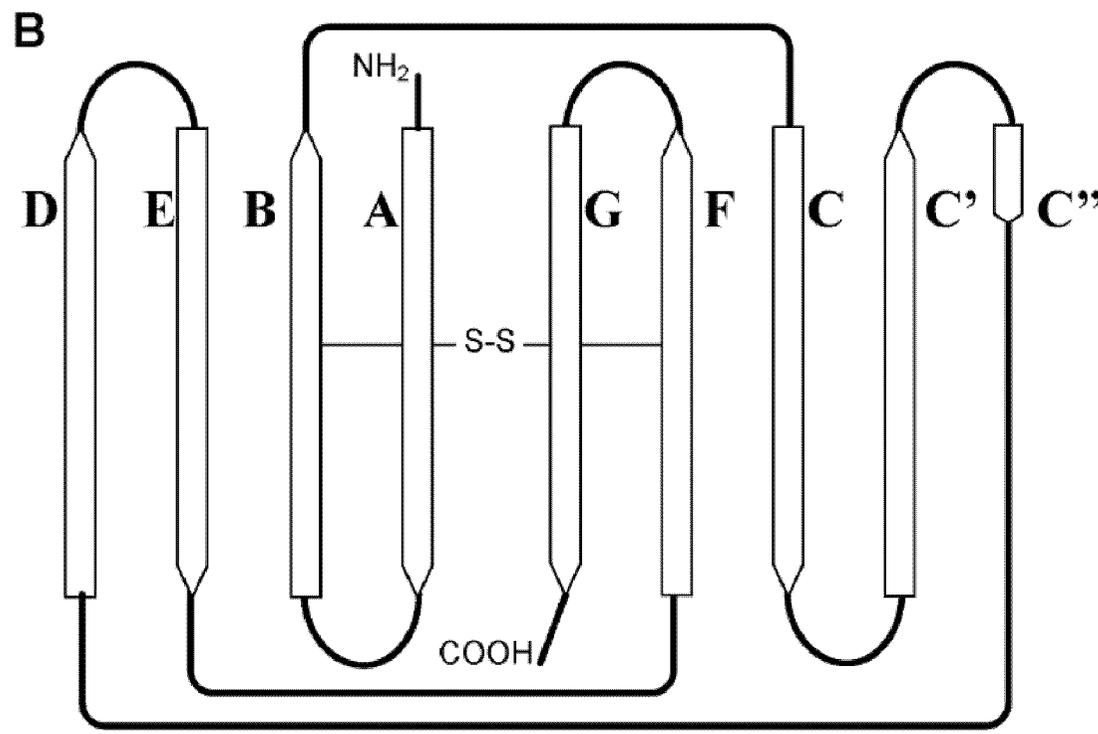
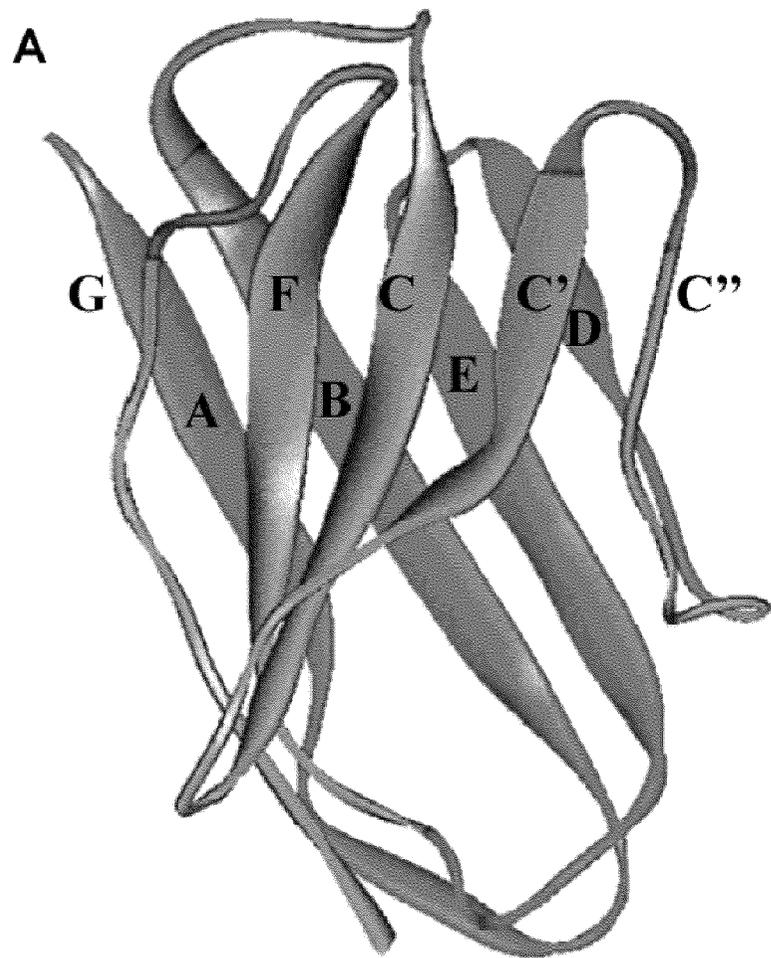
Последовательное
уничтожение Донор 15842



ФИГ. 40С



ФИГ. 40D



80/149

ФИГ. 41

Множественное выравнивание последовательностей и вторичная структура изотипов тяжелой цепи иммуноглобулина человека

C - вторичная структура спирали (петля)
 E - расширенная вторичная структура (β-цепь)
 H - спиральная вторичная структура (α-спираль)
 * - единственный, полностью консервативный остаток
 : - сохранение свойств - оценка > 0,5 по матрице Gonnet PAM 250
 . - отсутствие сохранения свойств - оценка < 0,5 по матрице Gonnet PAM 250

КОНФОРМАЦИЯ

sp | P01880 | IGHD_Человека
 sp | P01871 | IGHM_Человека
 sp | P01876 | IGHA1_Человека
 sp | P01877 | IGHA2_Человека
 sp | P01854 | IGHE_Человека
 sp | P01857 | IGHG1_Человека
 sp | P01860 | IGHG3_Человека
 sp | P01859 | IGHG2_Человека
 sp | P01861 | IGHG4_Человека

```

CCCCCCCCCEEECCCCC-CCCCCCCCEEEEEEEECCCCC-CEEEEEEECC-CCCCCCC
APTKAPDVFPISGCR-HPKDNSPVVLA CLITGYHPTS-VTVTWYMGTS--QPQRTFPE 56
GSASAPTLFPLVSCEN-SPSDTSSVAVGCLAQDFLPDS-ITFSWKYKMNSDISSTRGFPS 58
ASPTSPKVFPLSLCST-QPDG--NVVIACL VQGFPPQEPLSVTWSESGQG--VTARNFPP 55
ASPTSPKVFPLSLDST-PQDG--NVVACL VQGFPPQEPLSVTWSESGQN--VTARNFPP 55
ASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYFPEP-VMTWDTGSLN--GTTMTLPA 57
ASTKGPSVFPLAPSSKSTS--GGTAALGCLVKDYFPEP-VTVSWNSGALT--SGVHTFPA 55
ASTKGPSVFPLAPCSRSTS--GGTAALGCLVKDYFPEP-VTVSWNSGALT--SGVHTFPA 55
ASTKGPSVFPLAPCSRSTS--ESTAALGCLVKDYFPEP-VTVSWNSGALT--SGVHTFPA 55
ASTKGPSVFPLAPCSRSTS--ESTAALGCLVKDYFPEP-VTVSWNSGALT--SGVHTFPA 55
.   * : ** :           . . . **  :  *  :  : *           : *
|   НАЧАЛО CH1

```

ДОМЕН.

КОНФОРМАЦИЯ

sp | P01880 | IGHD_Человека
 sp | P01871 | IGHM_Человека
 sp | P01876 | IGHA1_Человека
 sp | P01877 | IGHA2_Человека
 sp | P01854 | IGHE_Человека
 sp | P01857 | IGHG1_Человека
 sp | P01860 | IGHG3_Человека
 sp | P01859 | IGHG2_Человека
 sp | P01861 | IGHG4_Человека

```

E-ECCCCEEEEEEEEEECCCCC--CCEEEEEEECCCCCEEE-----
I-QRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQ--GEYKCVVQHTASKSKKEIF-----98
V--LRGGKYAATSQVLLPSKDVMTQDDEHWCKVQHPNGNKEK--N--VPLPVIAELPPK 112
SQDASGDLYTTSSQLTLPA-----74
SQDASGDLYTTSSQLTLPA-----74
TTLTSLGHYATISLLTV-SGAWAK--QMFTRVAHTPSSTDWVDNKTFSVCSRDFTPPT 113
V-LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT---QTYTCNVNHKPSNTKVDDKVE-----99
V-LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT---QTYTCNVNHKPSNTKVDRKVELKTPLGDTTHTC 111
V-LQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGT---QTYTCNVNHKPSNTKVDDKTVVERK-----101
V-LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT---KTYTCNVNHKPSNTKVDDKRVESK-----101
. . * * * :

```

ДОМЕН.

КОНЕЦ CH1 |

КОНФОРМАЦИЯ

sp | P01880 | IGHD_Человека
 sp | P01871 | IGHM_Человека
 sp | P01876 | IGHA1_Человека
 sp | P01877 | IGHA2_Человека
 sp | P01854 | IGHE_Человека
 sp | P01857 | IGHG1_Человека
 sp | P01860 | IGHG3_Человека
 sp | P01859 | IGHG2_Человека
 sp | P01861 | IGHG4_Человека

```

-----ECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
-----RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLA 123
VS-VFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKES 171
-----74
-----74
VK-ILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGE--170
-----99
PRCPEPKSCDTPPPCPR----CPE---P-----K-----133
-----101
-----101

```

ДОМЕН

КОНФОРМАЦИЯ

sp | P01880 | IGHD_Человека
 sp | P01871 | IGHM_Человека
 sp | P01876 | IGHA1_Человека
 sp | P01877 | IGHA2_Человека
 sp | P01854 | IGHE_Человека
 sp | P01857 | IGHG1_Человека
 sp | P01860 | IGHG3_Человека
 sp | P01859 | IGHG2_Человека
 sp | P01861 | IGHG4_Человека

```

CCCCCCCCCCCC--CCCCCCCC--CEEECCCCCCCCCCCCCCCC--
KATTAPATTRNT---GRGGEKKK--EKEKEEQEERETKTPFCPSHT-----165
GPTYKYVTSLTIKESDWLQSMFTRVDHRGLT--FQQNASSMCPDQ-----218
-----TQCLAGKSVTCHVKHYTN--SQDVTVPVSTPPTPSPSTPPT 117
-----TQCPDGKSVTCHVKHYTNS--SQDVTVPCRVPP-----105
---LASTQSELTL SQKHWLSDRTYTCQVTYQGHT--FEDSTKCAD-SNP-----214
sp | P01857 | IGHG1_Человека PKSCDKTHTCPPCPAPELL-----118
sp | P01860 | IGHG3_Человека SCDTPPPCPRCPKSCDTPPPCPCPAPELL-----165
sp | P01859 | IGHG2_Человека CCVECPPCPAPPV-----114
sp | P01861 | IGHG4_Человека YGPPCPSCPAPELL-----115

```

ДОМЕН

| НАЧАЛО CH2

КОНФОРМАЦИЯ

sp | P01880 | IGHD_Человека
sp | P01871 | IGHM_Человека
sp | P01876 | IGHA1_Человека
sp | P01877 | IGHA2_Человека
sp | P01854 | IGHE_Человека
sp | P01857 | IGHG1_Человека
sp | P01860 | IGHG3_Человека
sp | P01859 | IGHG2_Человека
sp | P01861 | IGHG4_Человека

-----CCCCCEECC-CCCCCCCCCEEEEEEECCCEEE--EEEEEECCCCCCCCCE
-----CPLGVVLLTF-AVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKD--AHLTWEVAGKVPTGGVVEE 217
---DTAIRVFAIPP-SFASIFLTKSTKLTCLVTDLTYD-SVTISWTRONGEAVK-THT 271
BSPSCCHPRLSLHRR-ALEDLLGSEANLTCITLGLRDAS-GVTFWTWTPSSGKSAV-QGP 174
-FPPCCHPRLSLHRR-ALEDLLGSEANLTCITLGLRDAS-GATFTWTPSSGKSAV-QGP 161
-----RGVSAYLSRPSRF-DLFIKRSPTITCLVVDLAPSKGTWNLTWSRASGKPVN-HST 267
-----GCP SVFLFPPPKKDTLMI SRTP EVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN-AKT 172
-----GCP SVFLFPPPKKDTLMI SRTP EVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN-AKT 219
-----AGP SVFLFPPPKKDTLMI SRTP EVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN-AKT 168
-----GCP SVFLFPPPKKDTLMI SRTP EVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN-AKT 169
* : : .** :. . :.*

ДОМЕН

КОНФОРМАЦИЯ

sp | P01880 | IGHD_Человека
sp | P01871 | IGHM_Человека
sp | P01876 | IGHA1_Человека
sp | P01877 | IGHA2_Человека
sp | P01854 | IGHE_Человека
sp | P01857 | IGHG1_Человека
sp | P01860 | IGHG3_Человека
sp | P01859 | IGHG2_Человека
sp | P01861 | IGHG4_Человека

CCEEECCCCCEEECCCEEECCCHHCEEEEEEECCCEEEEEECCCCCCCCCEEEEEECCCCCCCCCCCC
GLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPLQRLMALREPAQAQPVKLSL 277
NISESHPNATFSAVGEASICEEDWNSGERFCTCTVHTDLPSPKQTI SRPKGVALHRPOV 331
--PERDLGCGYSVSSVLPGCAEPWNHGKFTCTAAYPESKTPLTATLSKS--GNTFRPEV 230
--PERDLGCGYSVSSVLPGCAEPWNHGKFTCTAAYPELKLPLTANITKS--GNTFRPEV 217
RKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTDRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSSTTKTSGP-RAAPEV 326
KPREEQYNSTYRVS SVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIIEKTIKAKKGQ-PREPQV 231
KPREEQYNSTYRVS SVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIIEKTIKAKKGQ-PREPQV 278
KPREEQFNSTYRVS SVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIIEKTIKAKKGQ-PREPQV 227
KPREEQFNSTYRVS SVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKKGQ-PREPQV 228
* . . . * * * *
КОНЕЦ CH2 | НАЧАЛО CH1 | CH3

ДОМЕН

КОНФОРМАЦИЯ

sp | P01880 | IGHD_Человека
sp | P01871 | IGHM_Человека
sp | P01876 | IGHA1_Человека
sp | P01877 | IGHA2_Человека
sp | P01854 | IGHE_Человека
sp | P01857 | IGHG1_Человека
sp | P01860 | IGHG3_Человека
sp | P01859 | IGHG2_Человека
sp | P01861 | IGHG4_Человека

CCCCCCCC---CCCEEEEEEECCCEEEEEECCCEEEEEECCCEEECCCCCCCCCCCC---CCCCC
NLLASSDPP--EAASNLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVENTSGFAPAPPE--DOPRST 332
YLLPPAREQLNLRRESATITCLVTGFSADVFVQWQMGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAP-G 390
HLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKQDLVRLWLGSGQLPREKYL TWASRQEPESQGT 290
HLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKQDLVRLWLGSGQLPREKYL TWASRQEPESQGT 277
YAFATPEWPGS-RDKRTLACLIGNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTKG---S 382
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPMLOSD---G 285
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQ--PENNYNTTPMLOSD---G 332
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPMLOSD---G 281
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPMLOSD---G 282
: : * . * * : : *

ДОМЕН

КОНФОРМАЦИЯ

sp | P01880 | IGHD_Человека
sp | P01871 | IGHM_Человека
sp | P01876 | IGHA1_Человека
sp | P01877 | IGHA2_Человека
sp | P01854 | IGHE_Человека
sp | P01857 | IGHG1_Человека
sp | P01860 | IGHG3_Человека
sp | P01859 | IGHG2_Человека
sp | P01861 | IGHG4_Человека

CCCEEEEEEECCCCCCCCCEEEEEEECCCEEEEEECCCEEEEEECCCEEECCCC-----CC--
TFWANSVL RVPAPPSPQATYTCVWSHEDSRLLNASRSL EVSYVT-----DH-- 380
RYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPN-RVTERTVOKSTGKPTLYNVS LVMSDTA 449
TFAVTSLRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEALPL-AFTQKTI DRLAGKPTHVNSVVM A EVD 349
TYAVTSLRVA AEDWKKGETFSCMVGHEALPL-AFTQKTI DORMAGKPTHINVSVM A EAD 336
GFFVFSRL EVTRAWEQKDEFICRAVHEAASPSQT VQRAVSVNPGK-----428
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN-HYTQKSLSLSPGK-----330
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN-RFTQKSLSLSPGK-----377
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN-HYTQKSLSLSPGK-----326
SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN-HYTQKSLSLSLGK-----327
: * * * : * . **
КОНЕЦ CH3 |

ДОМЕН

КОНФОРМАЦИЯ

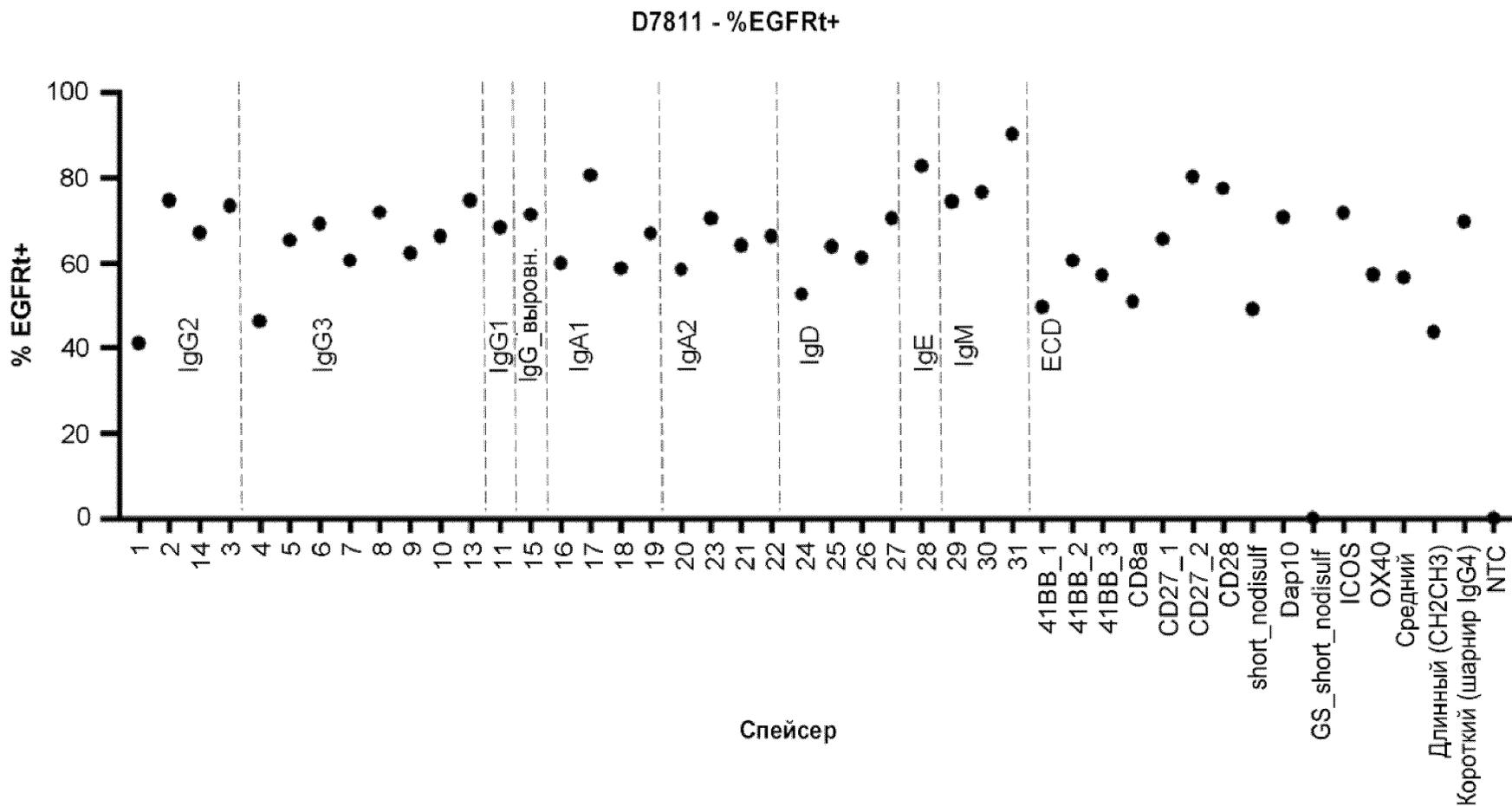
sp | P01880 | IGHD_Человека
sp | P01871 | IGHM_Человека
sp | P01876 | IGHA1_Человека
sp | P01877 | IGHA2_Человека
sp | P01854 | IGHE_Человека
sp | P01857 | IGHG1_Человека
sp | P01860 | IGHG3_Человека
sp | P01859 | IGHG2_Человека
sp | P01861 | IGHG4_Человека

Table with 2 columns: Accession ID, Value. Rows: CCCC, GPMK 384, GTCY 453, GTCY 353, GTCY 340, ---- 428, ---- 330, ---- 377, ---- 326, ---- 327

ДОМЕН

ФИГ. 42 (продолжение)

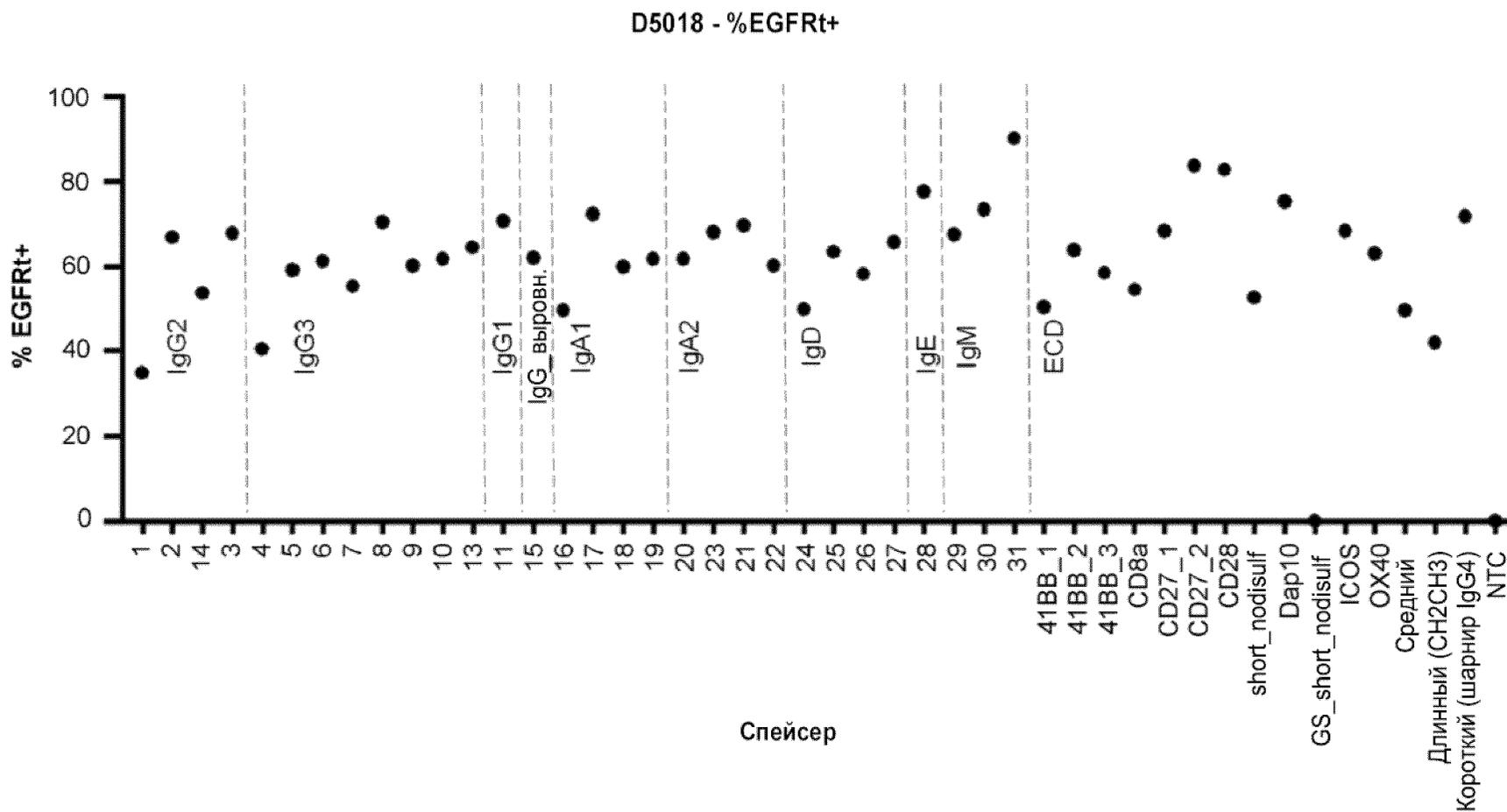
Эффективность трансдукции CAR R11 для Донора 1 и 2



84/149

ФИГ. 44А

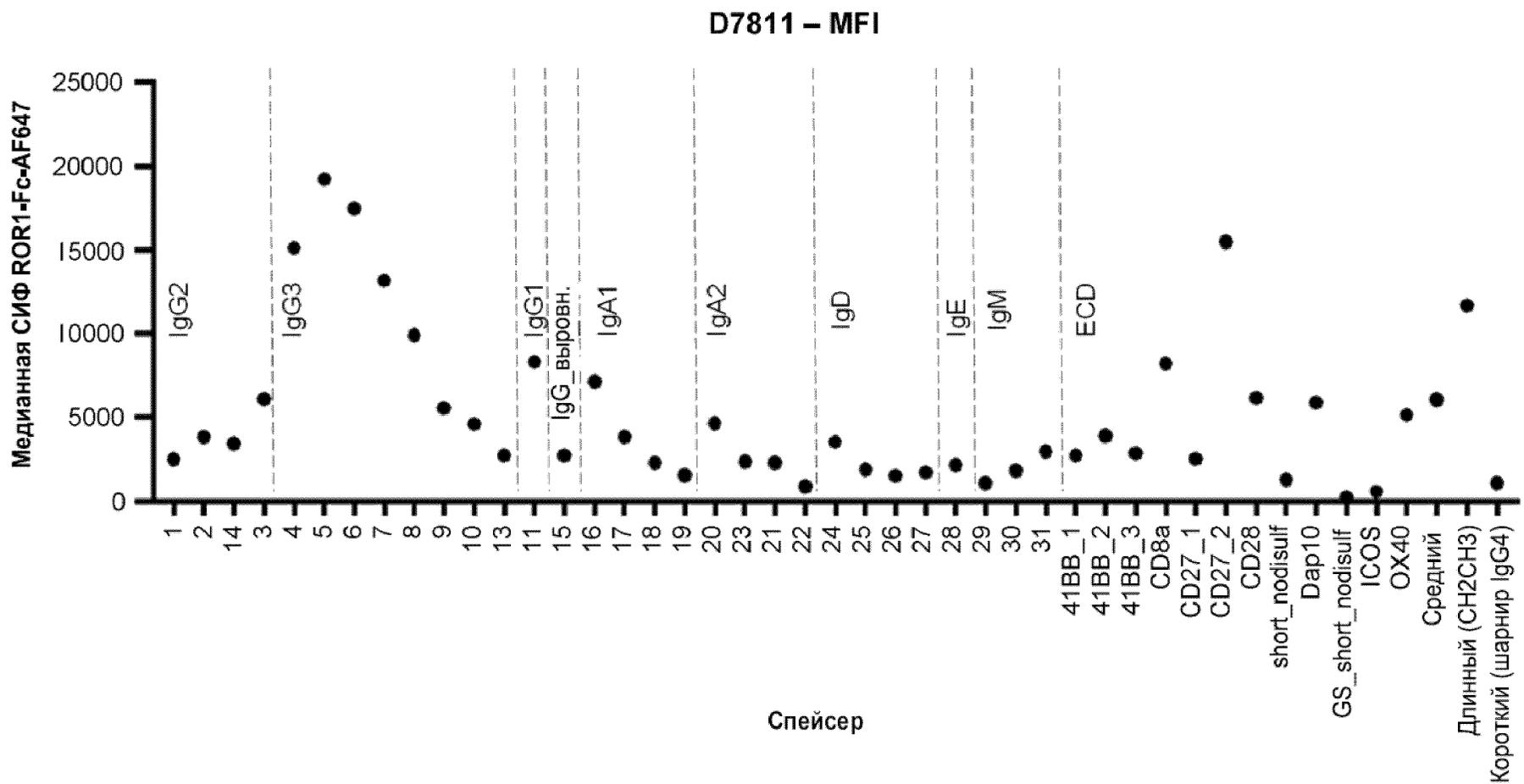
Эффективность трансдукции CAR R11 для Донора 1 и 2



85/149

ФИГ. 44В

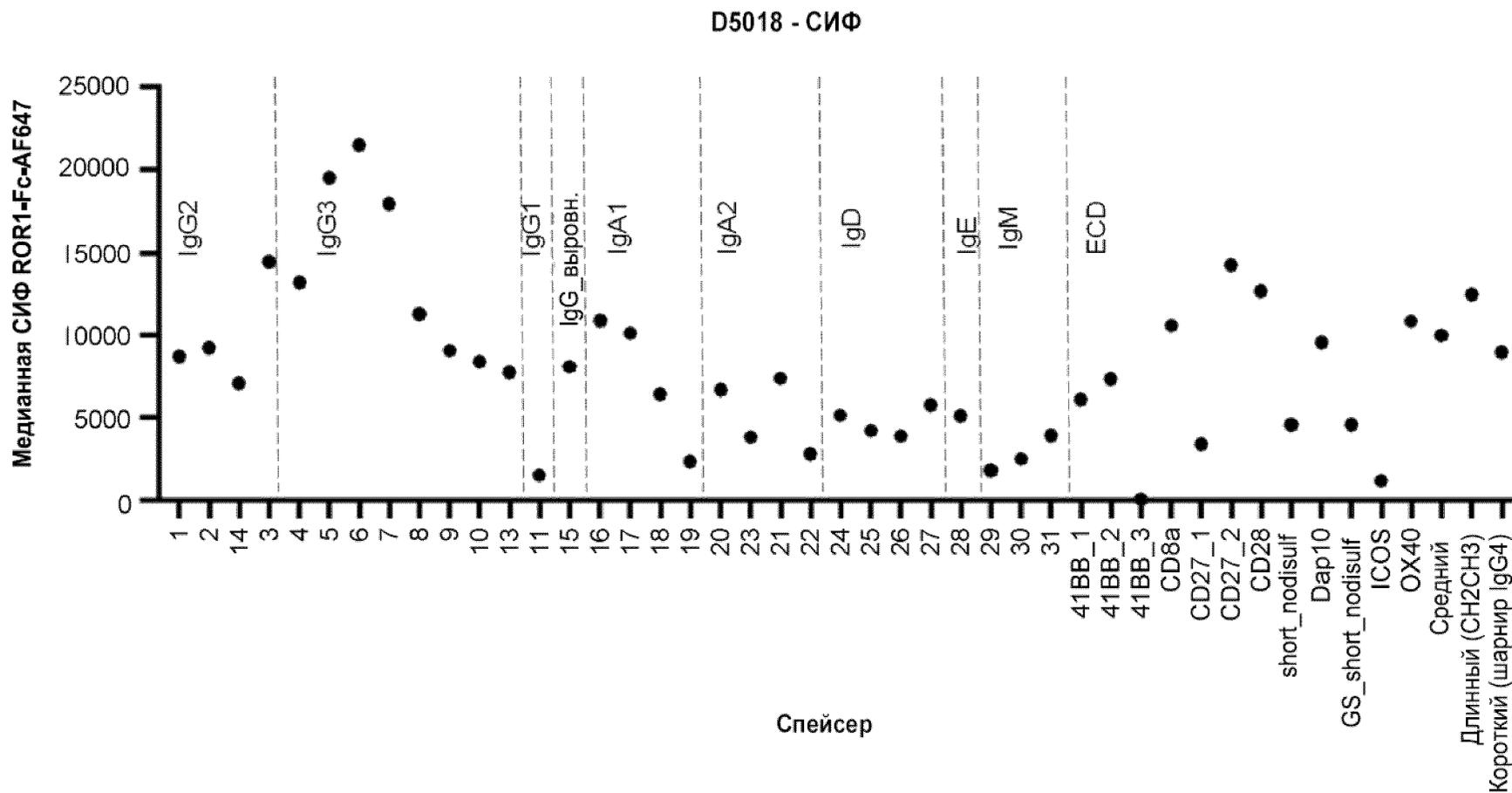
Эффективность трансдукции CAR R11 для Донора 1 и 2



86/149

ФИГ. 44С

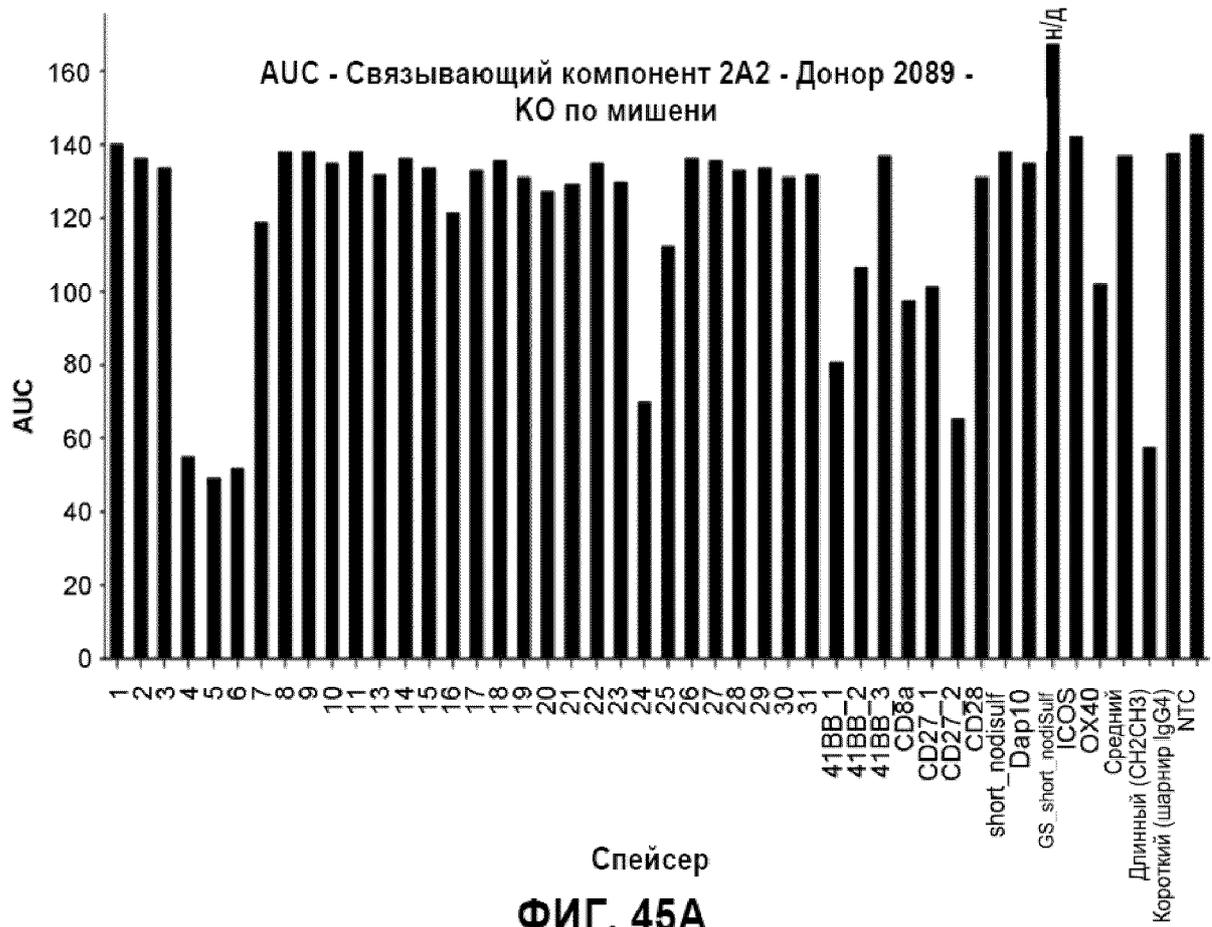
Эффективность трансдукции CAR R11 для Донора 1 и 2



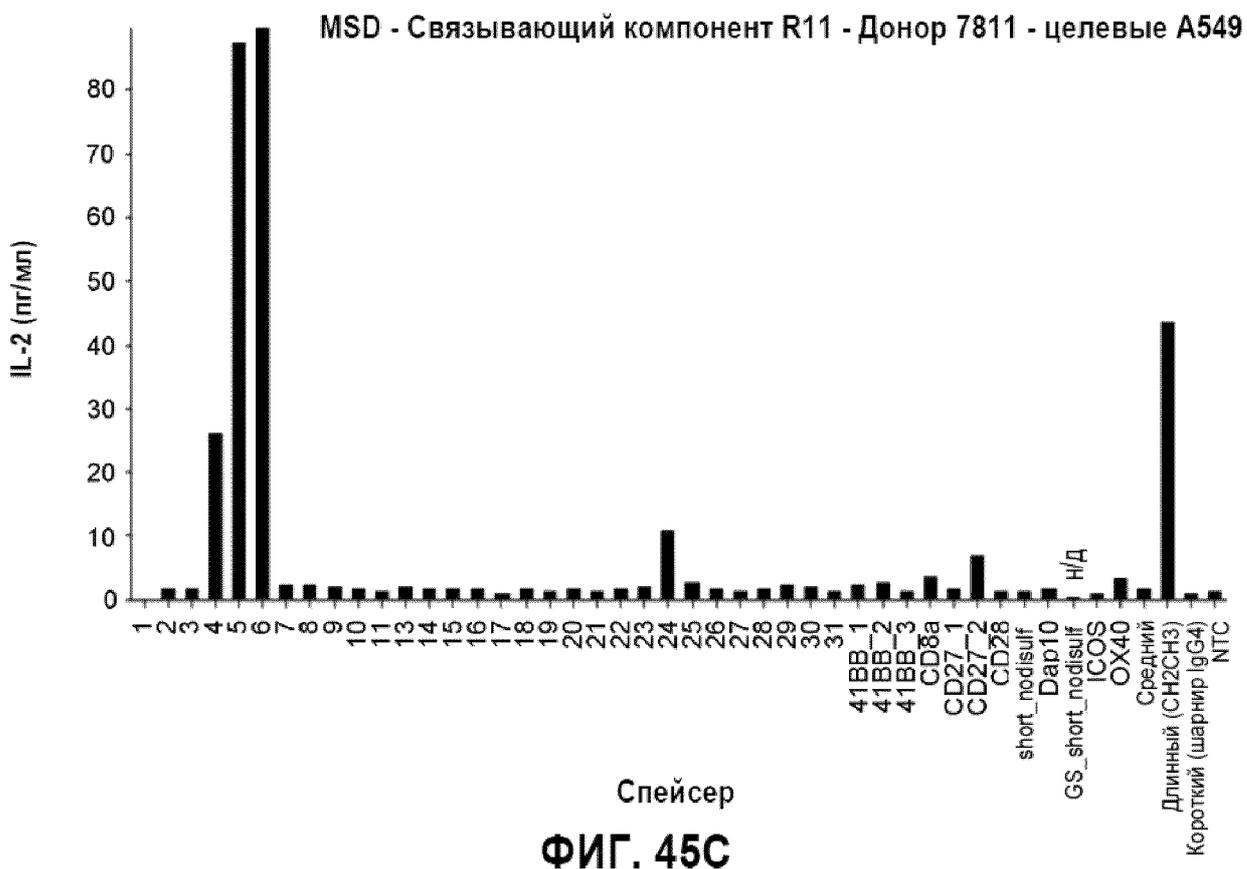
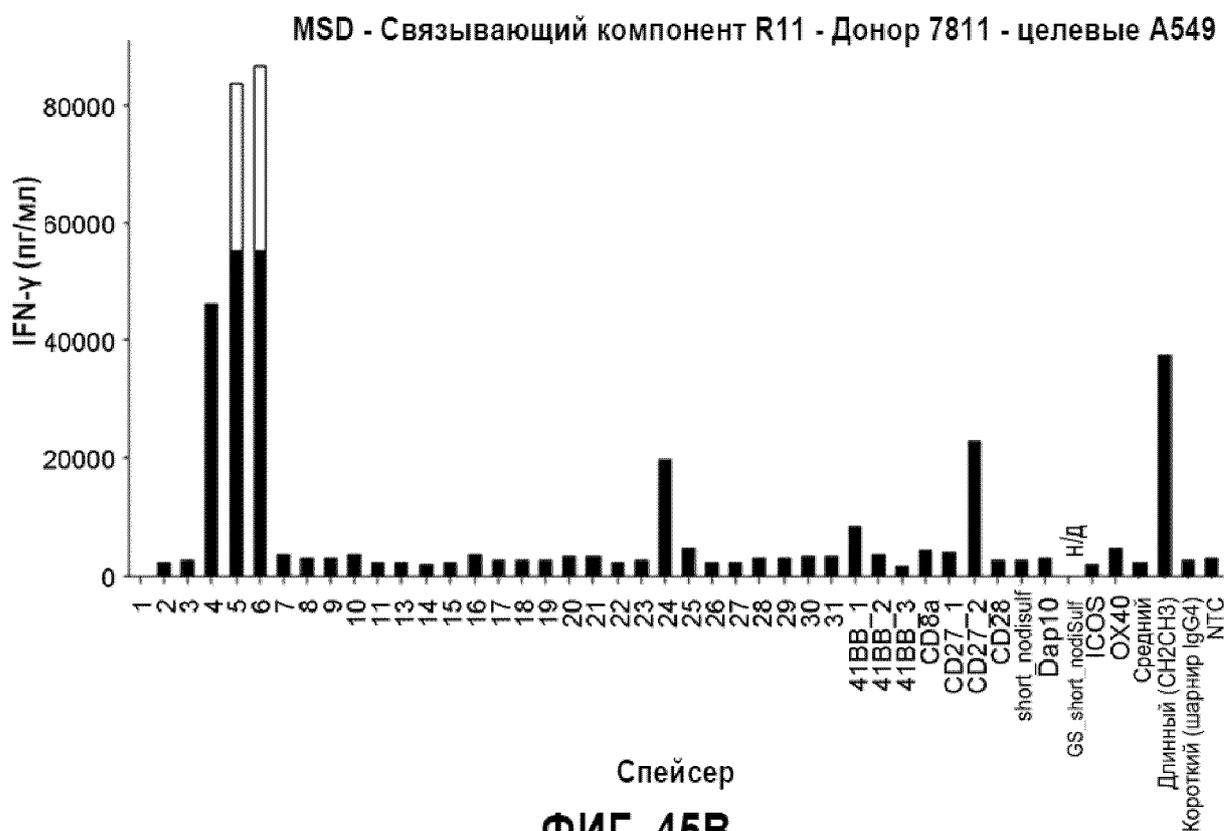
87/149

ФИГ. 44D

Первичное уничтожение и AUC R11-CAR-T D7811: A549-NLR 1:1

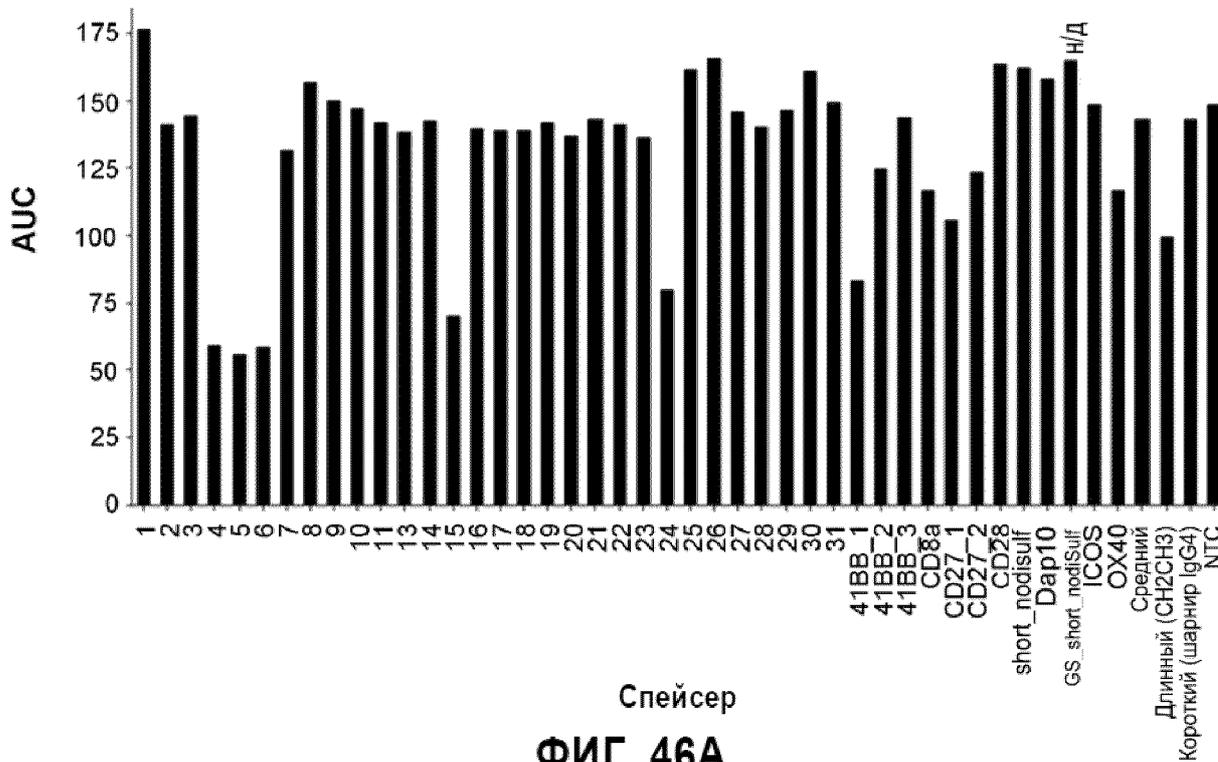


Первичное уничтожение и AUC R11-CAR-T D7811: A549-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC R11-CAR-T D5018: A549-NLR 1:1

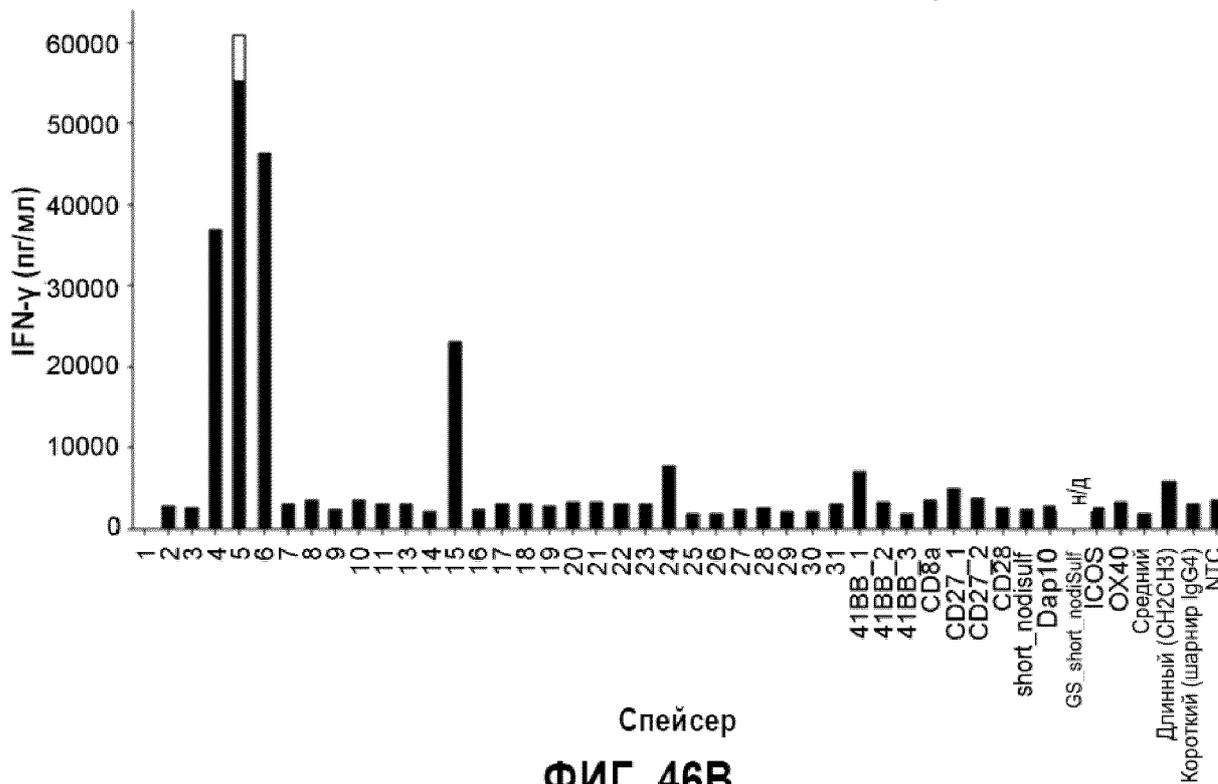
AUC - Связывающий компонент R11 - Донор 5018 - целевые A549



ФИГ. 46А

Первичное уничтожение и AUC R11-CAR-T D5018: A549-NLR 1:1

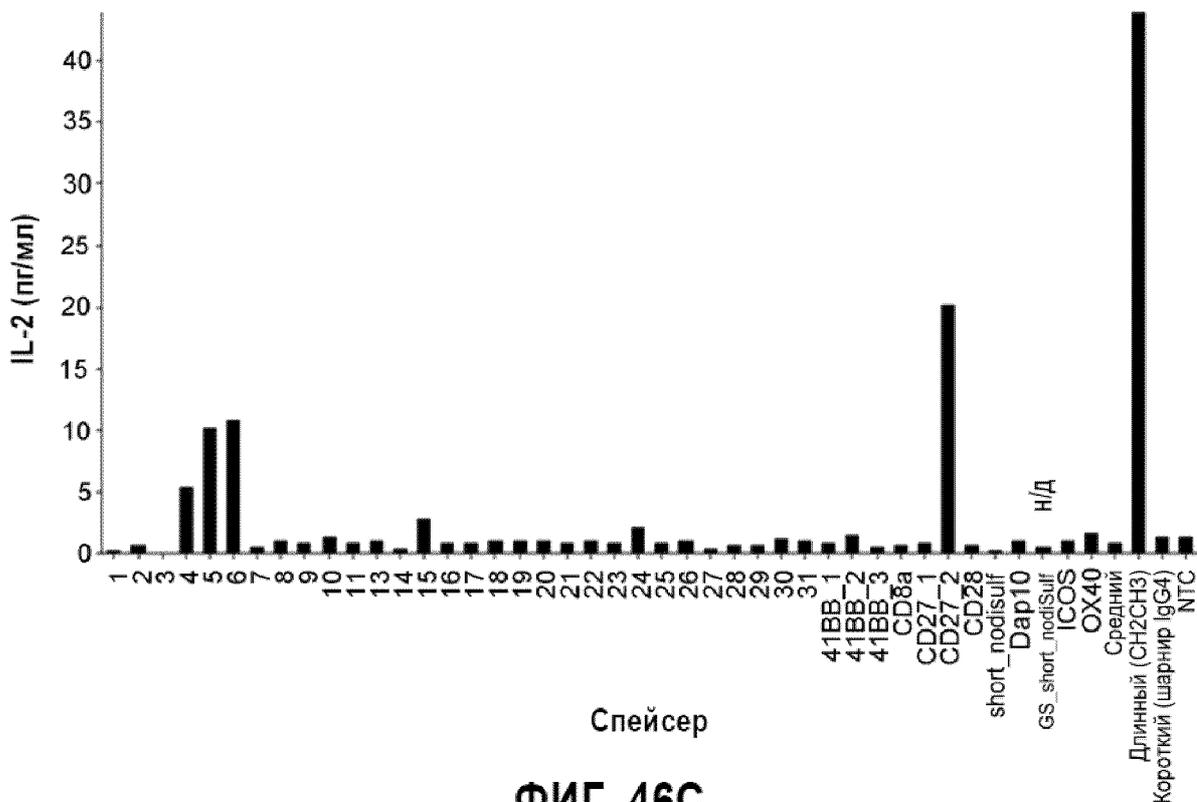
MSD - Связывающий компонент R11 - Донор 5018 - целевые A549



ФИГ. 46В

91/149

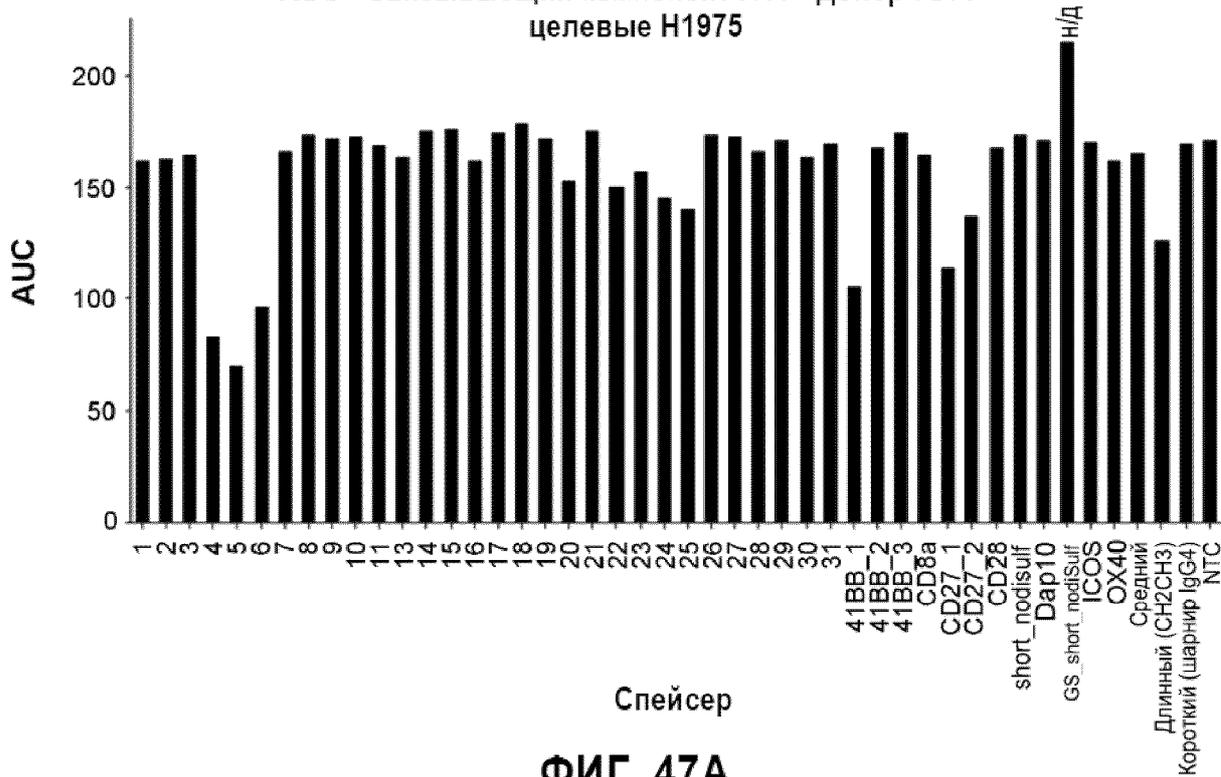
MSD - Связывающий компонент R11 - Донор 5018
- целевые A549



ФИГ. 46С

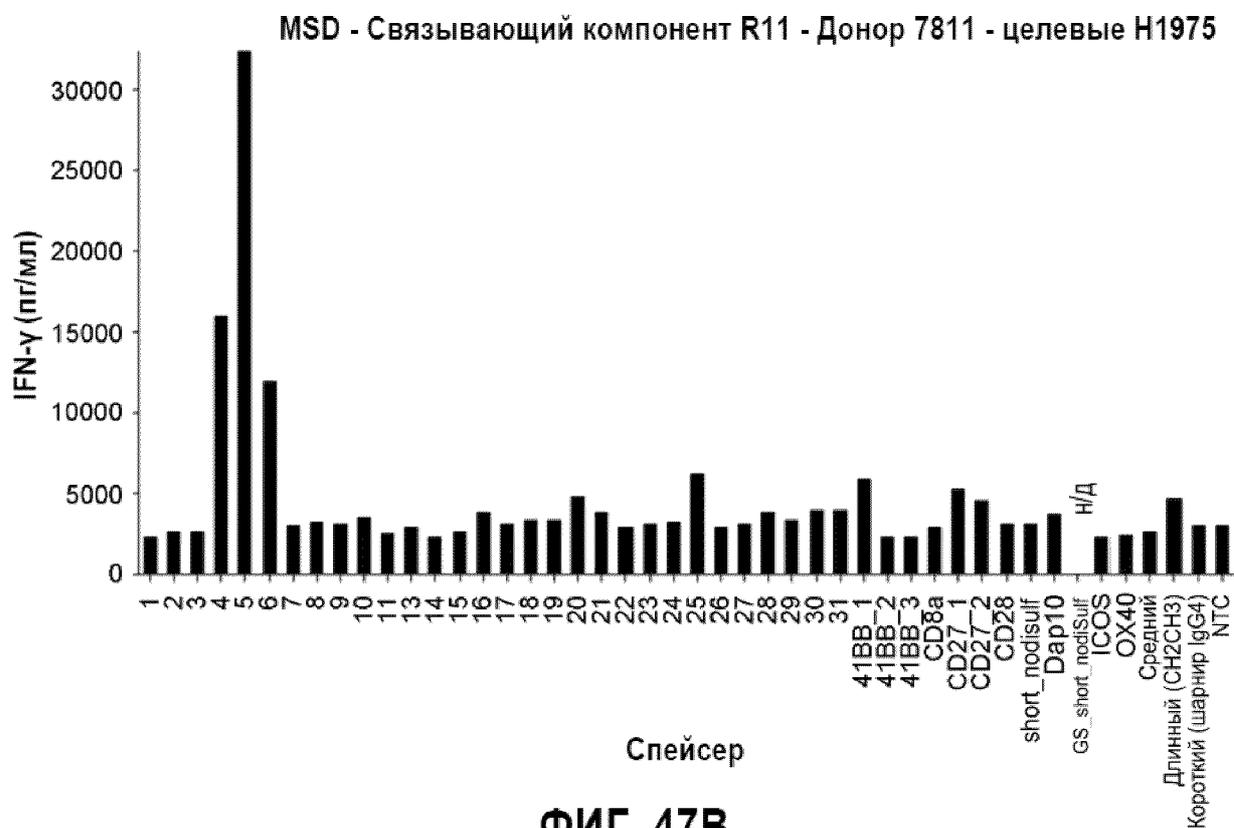
Первичное уничтожение и AUC R11-CAR-T D7811: H1975-NLR 1:1

AUC - Связывающий компонент R11 - Донор 7811 -
целевые H1975

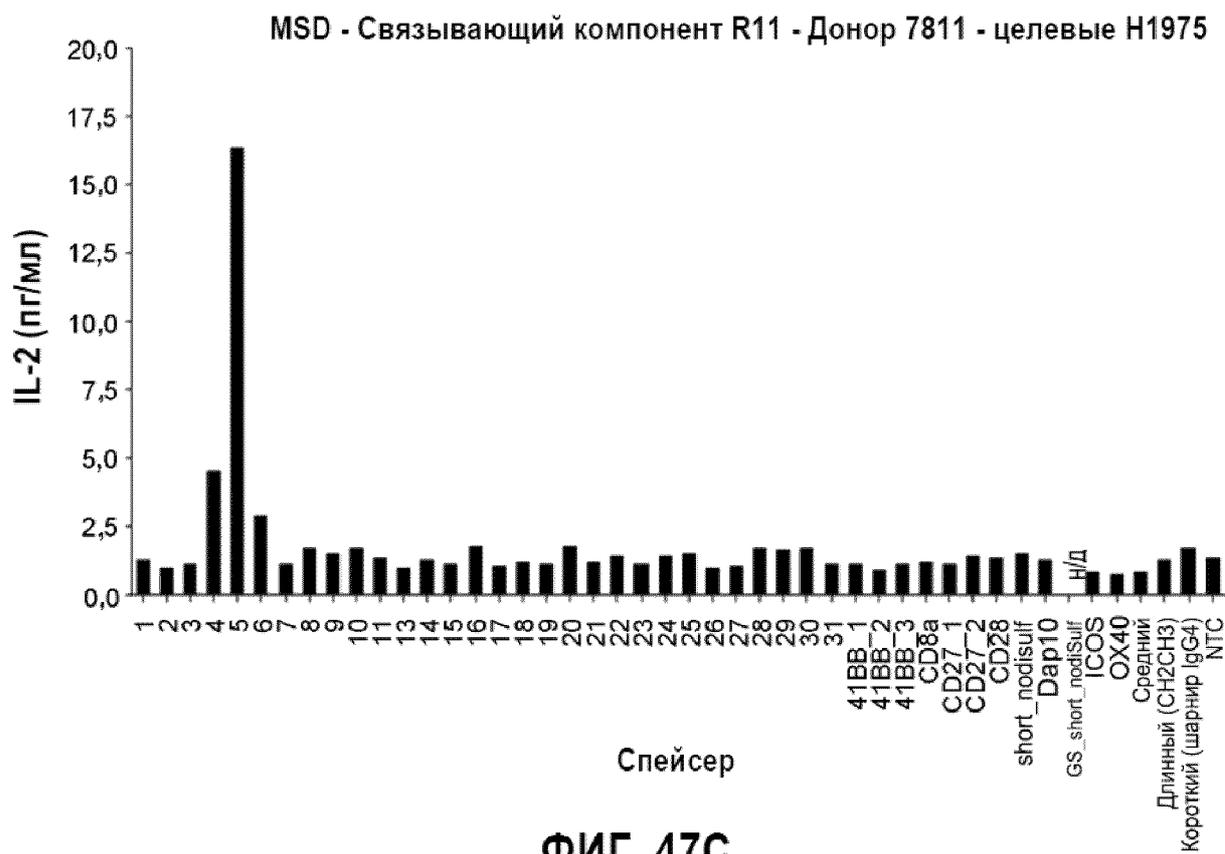


ФИГ. 47А

Первичное уничтожение и AUC R11-CAR-T D7811: H1975-NLR 1:1



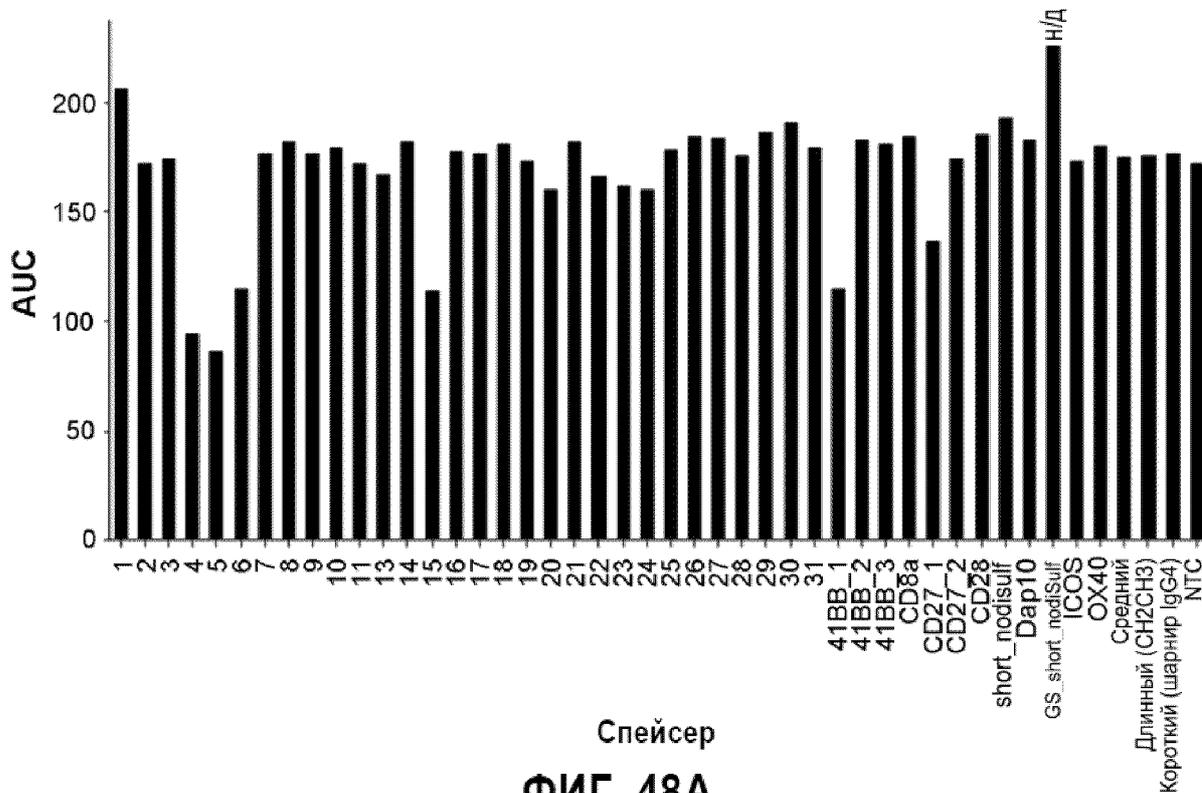
ФИГ. 47В



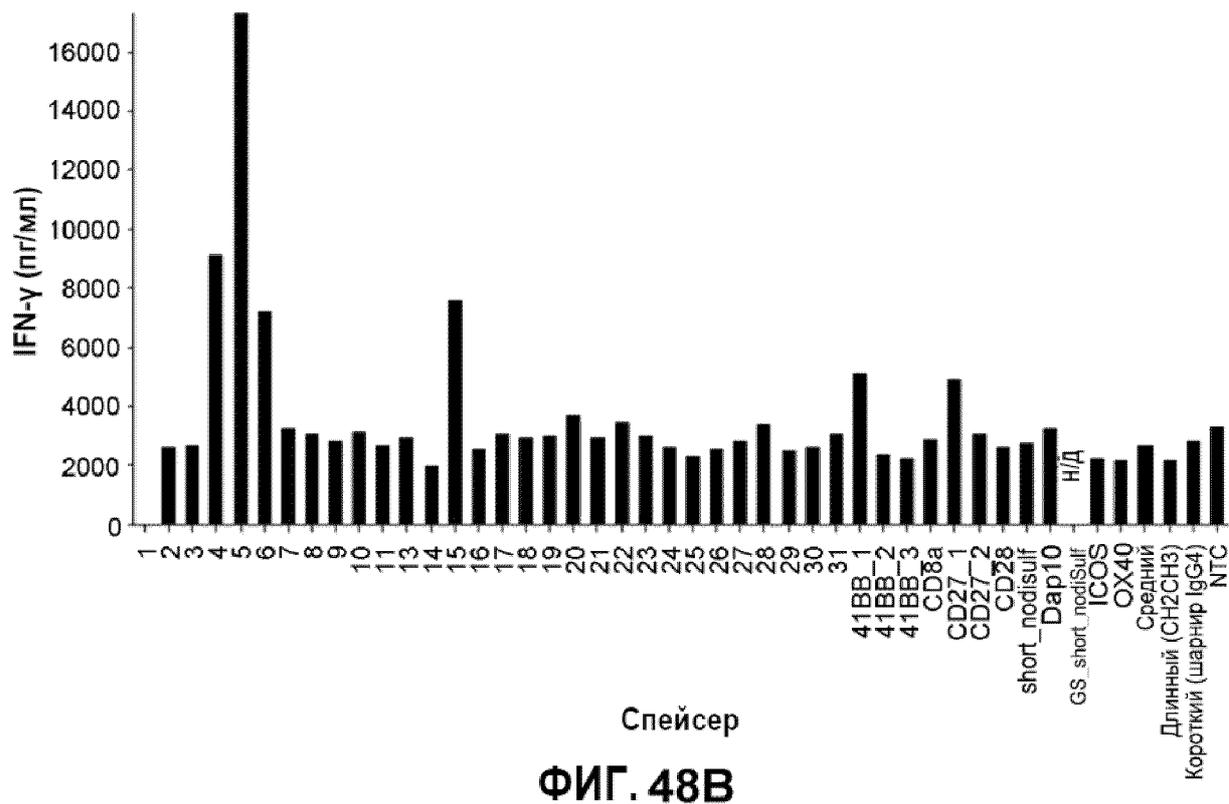
ФИГ. 47С

Первичное уничтожение и AUC R11-CAR-T D5018: H1975-NLR 1:1

AUC - Связывающий компонент R11 - Донор 5018 - целевые H1975

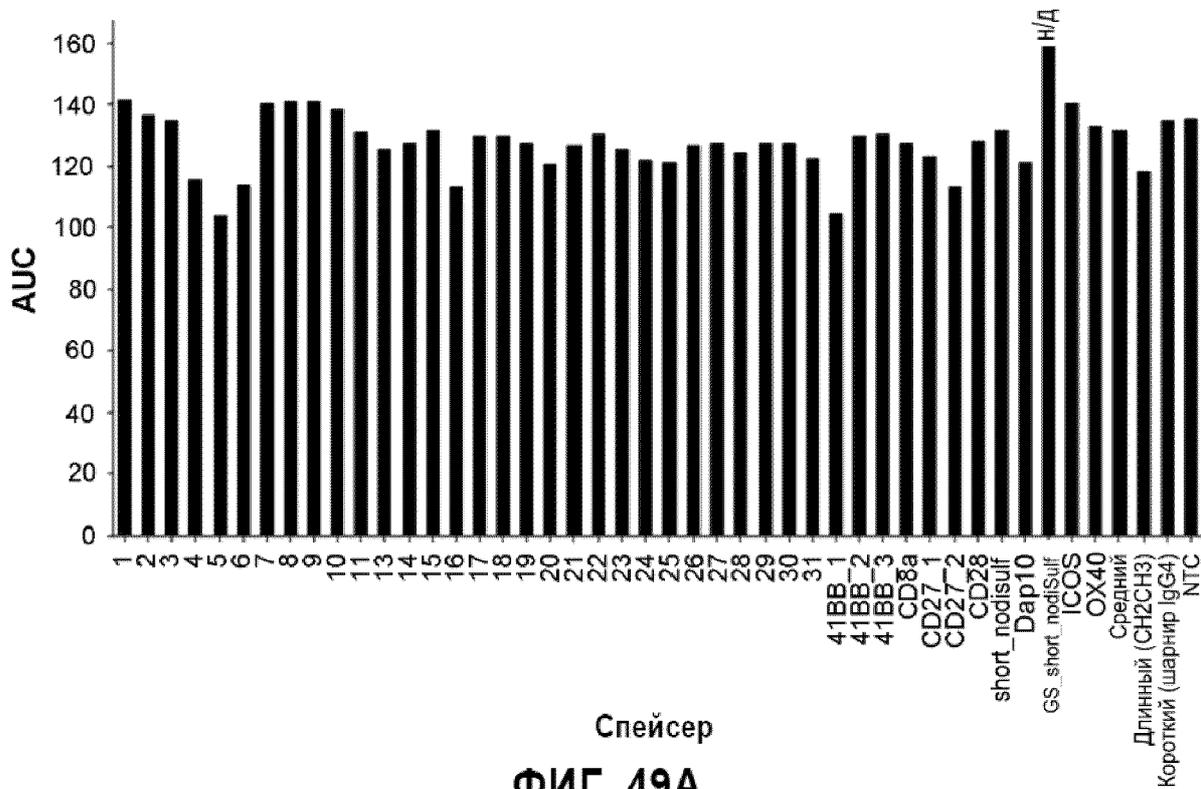


MSD - Связывающий компонент R11 - Донор 5018 - целевые H1975



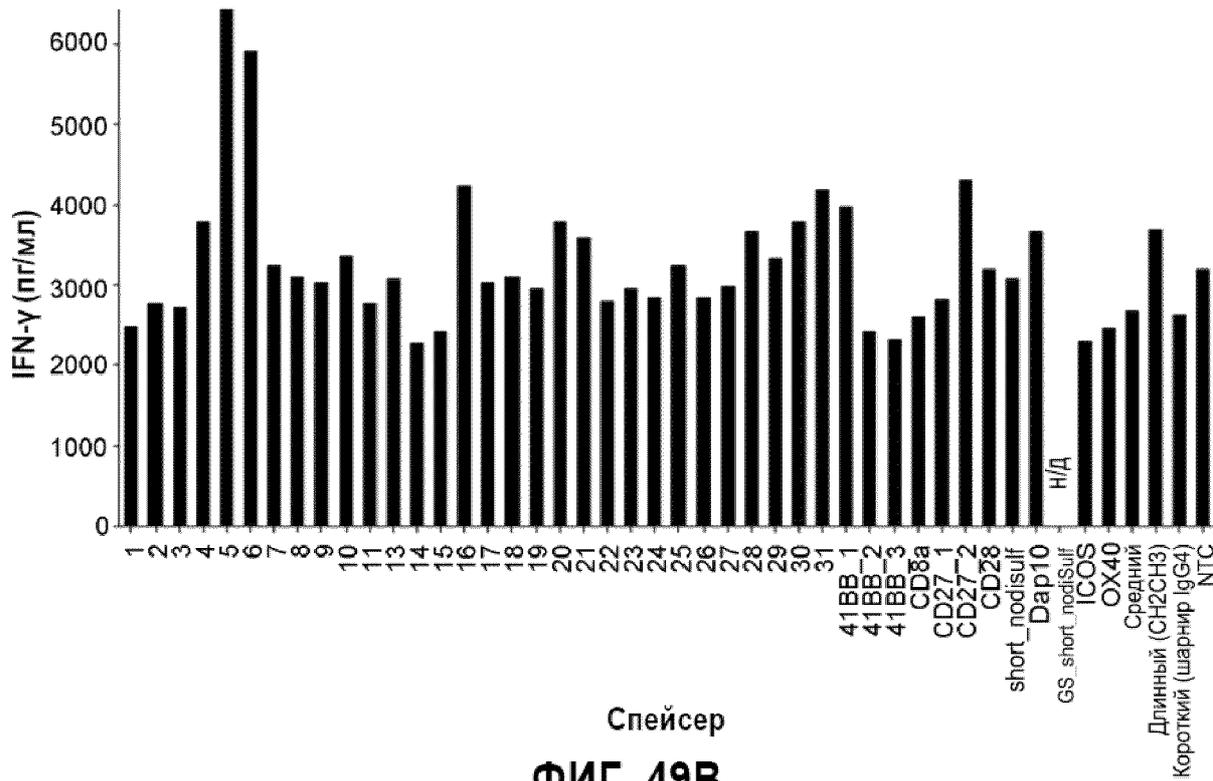
Первичное уничтожение и AUC R11-CAR-T D7811: A549-ROR1KO-NLR 1:1

AUC - Связывающий компонент R11 - Донор 7811 - КО по мишени



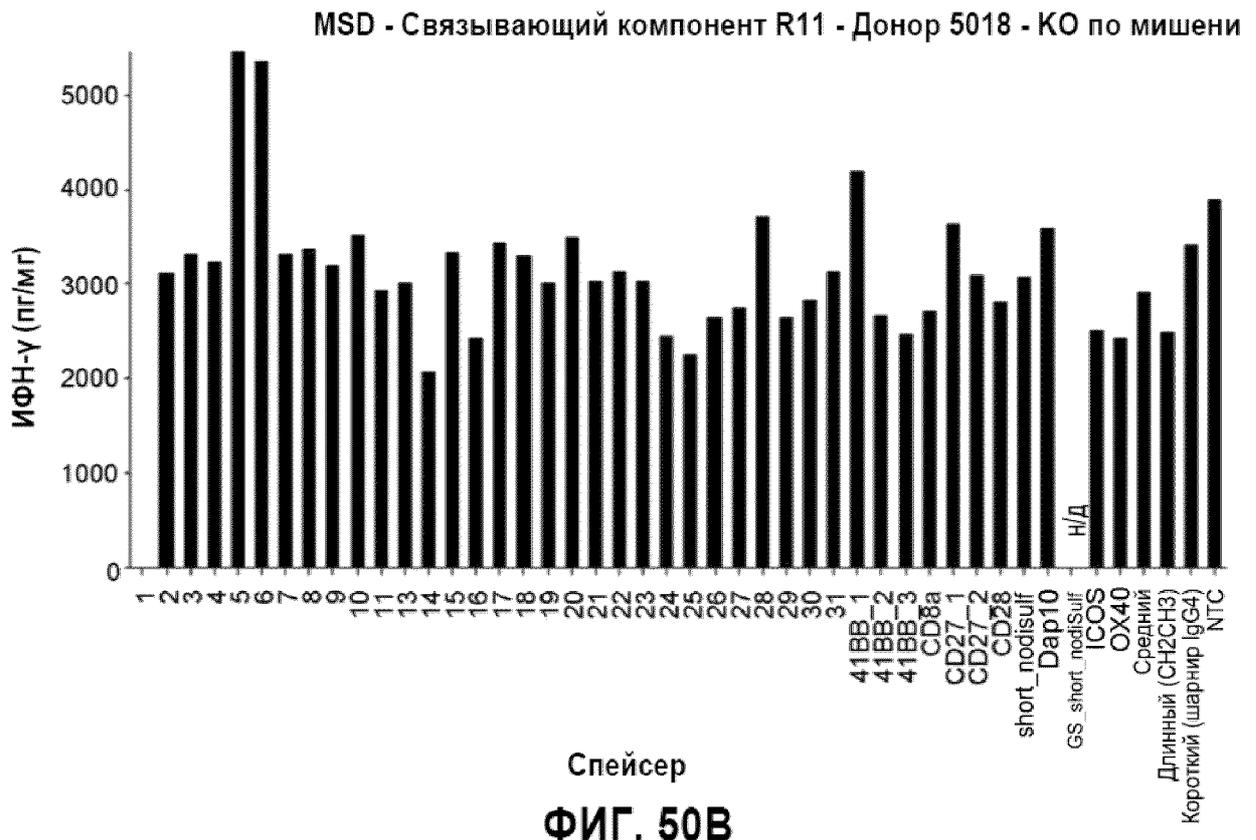
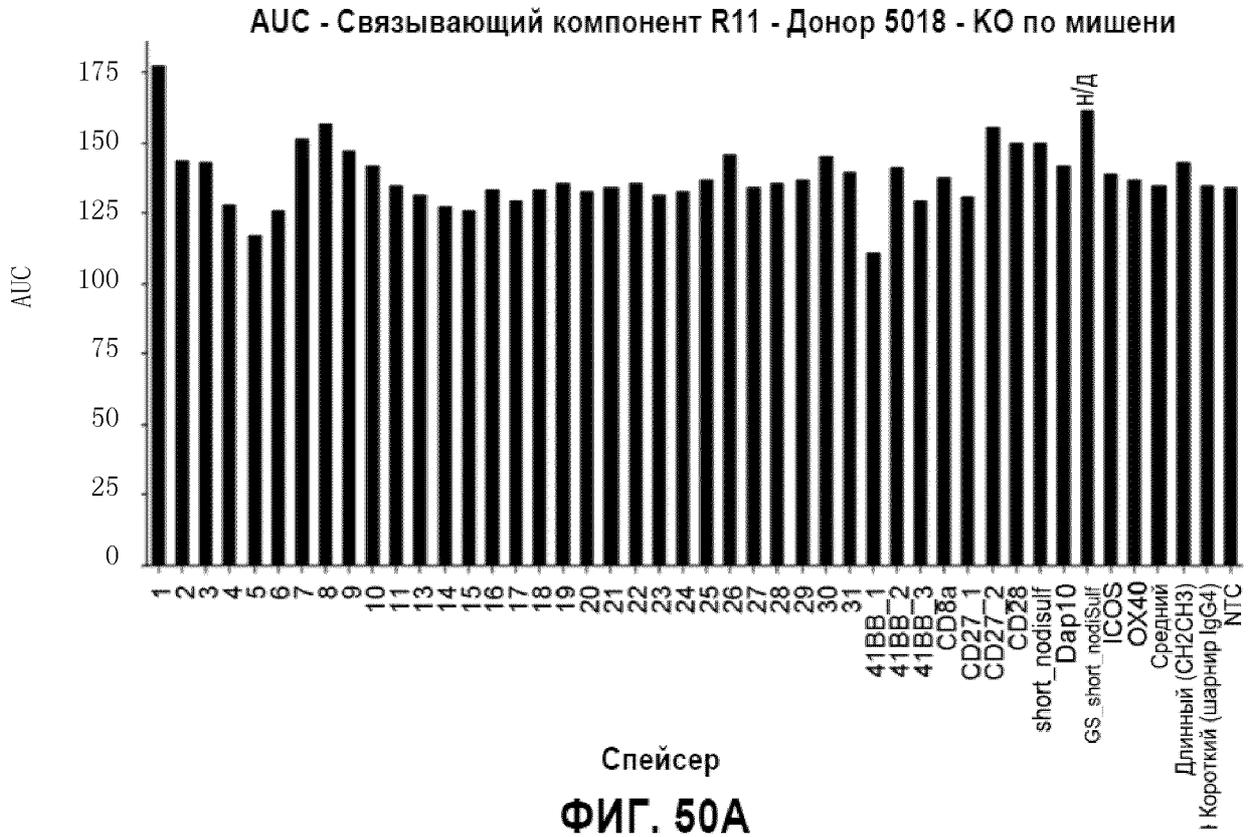
ФИГ. 49А

MSD - Связывающий компонент R11 - Донор 7811 - КО по мишени



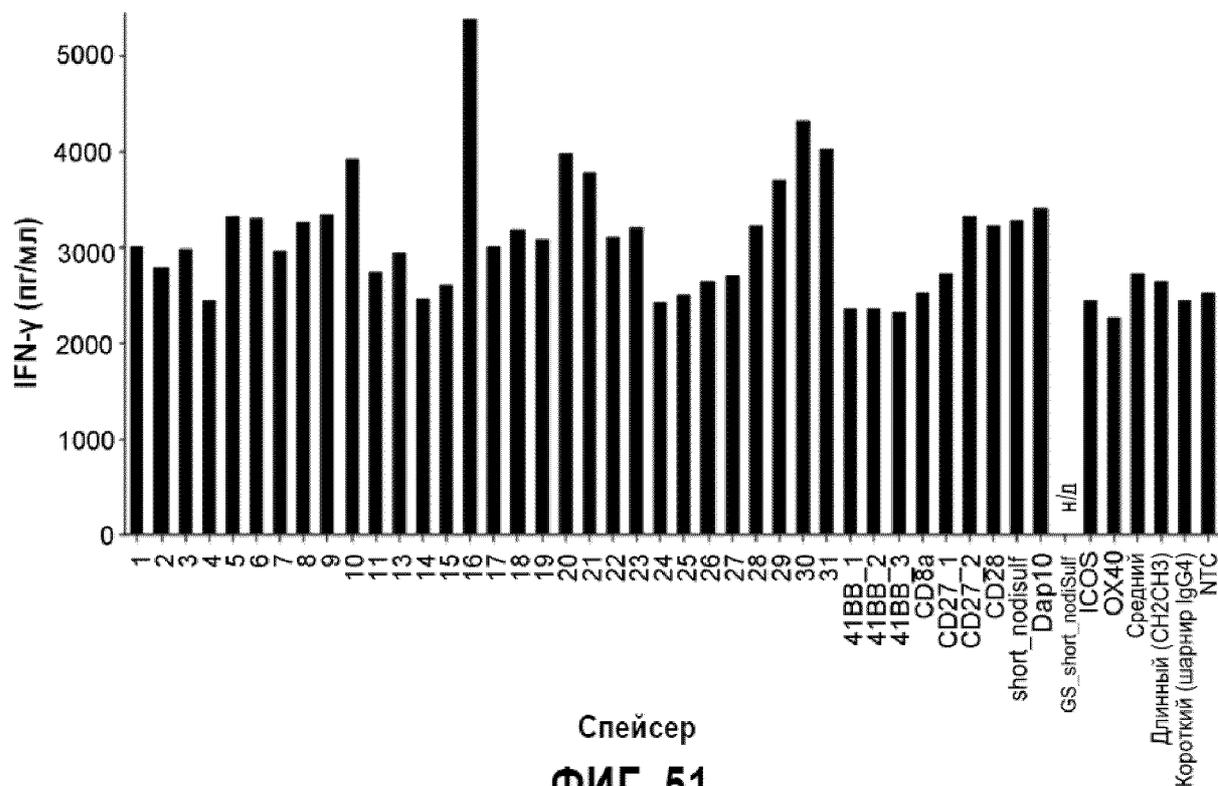
ФИГ. 49В

Первичное уничтожение и AUC R11-CAR-T D5018: A549-ROR1KO-NLR 1:1



Независимые от мишени цитокины для R11-CAR-T D7811

MSD - Связывающий компонент R11 - Донор 7811 - NONE по мишени

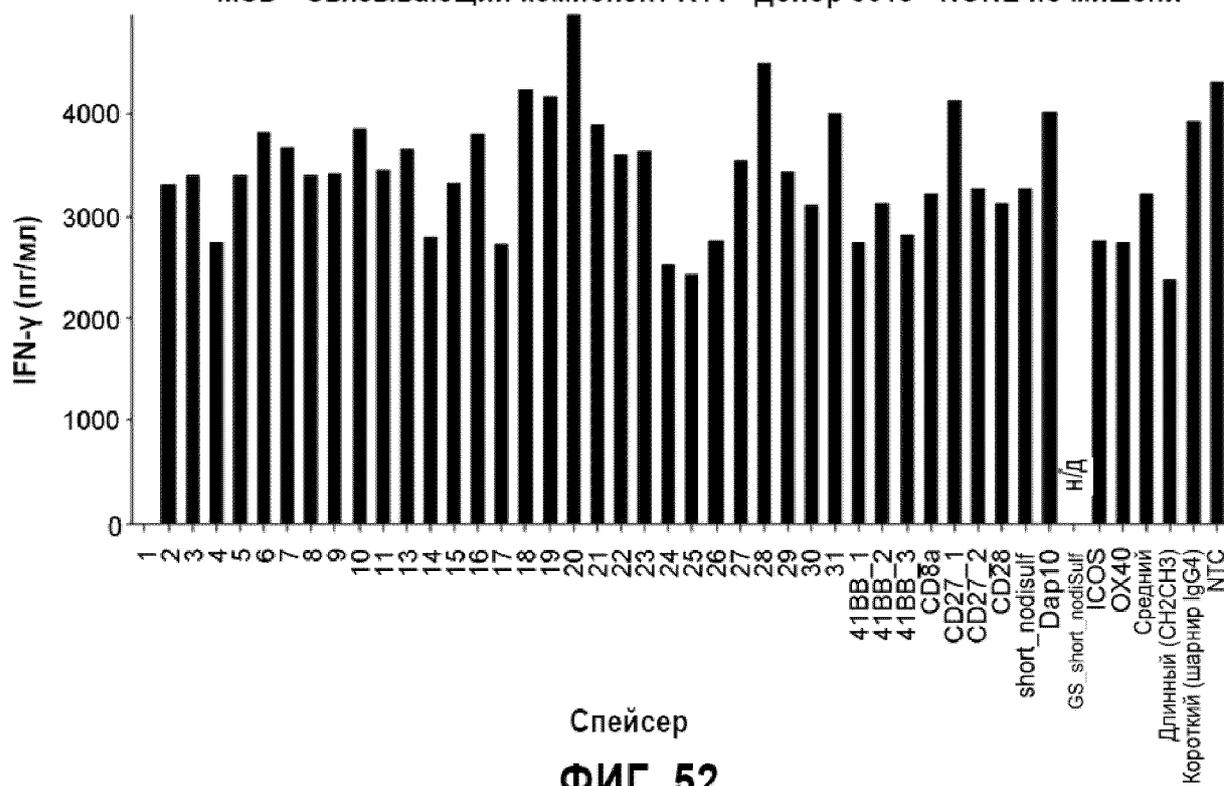


Спейсер

ФИГ. 51

Независимые от мишени цитокины для R11-CAR-T D5018

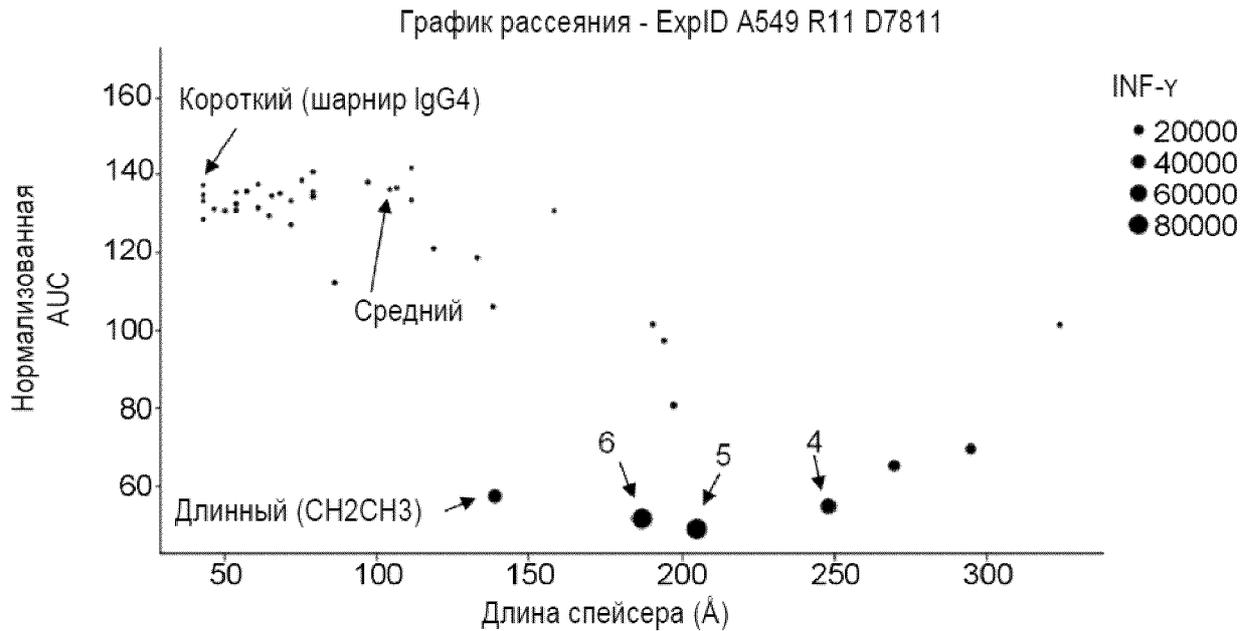
MSD - Связывающий компонент R11 - Донор 5018 - NONE по мишени



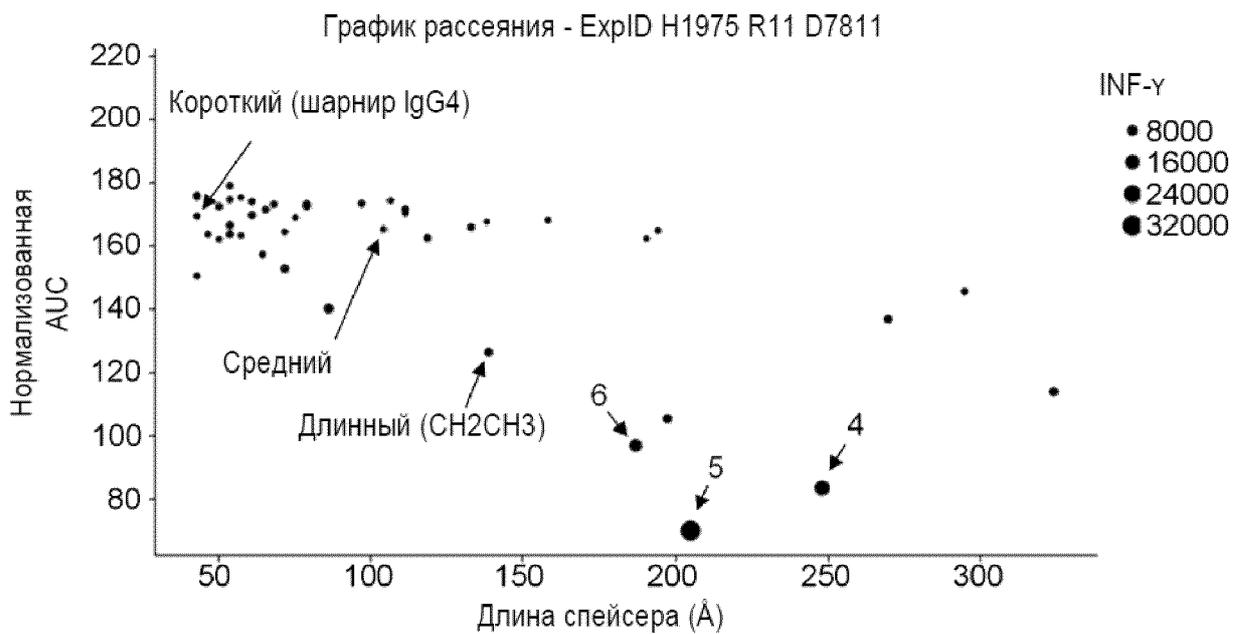
Спейсер

ФИГ. 52

R11-CAR-T D7811 Графики рассеяния указывают на оптимальную длину спейсера для R11, равную ~200Å

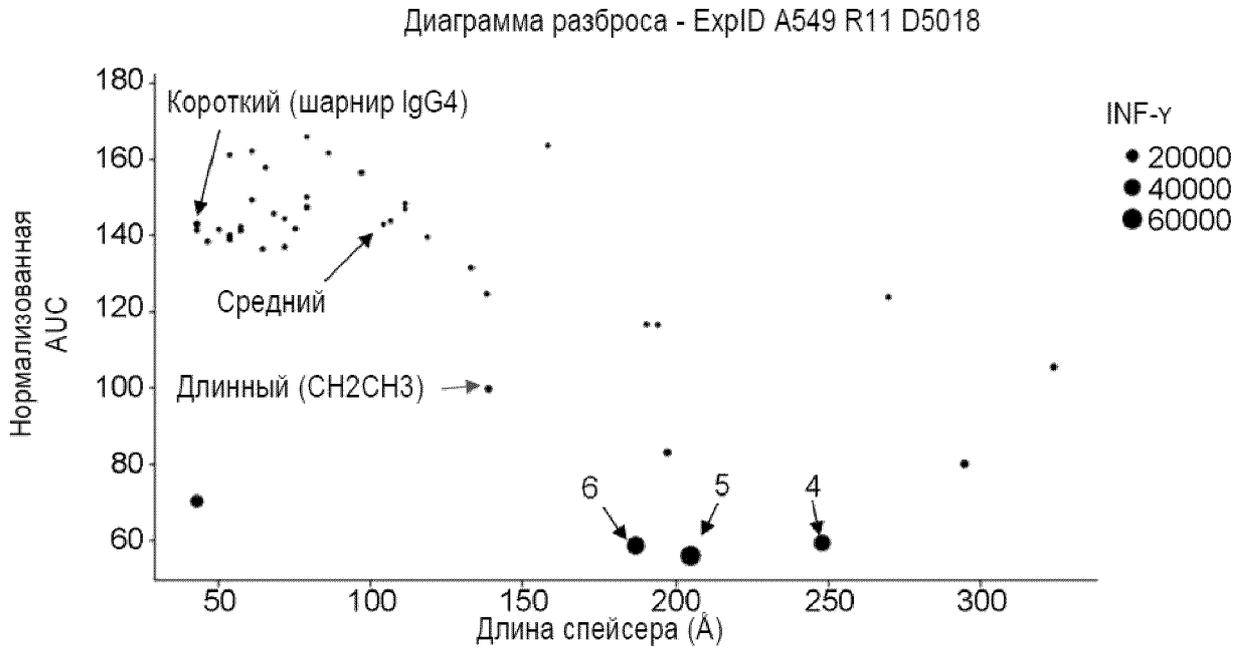


ФИГ. 53А

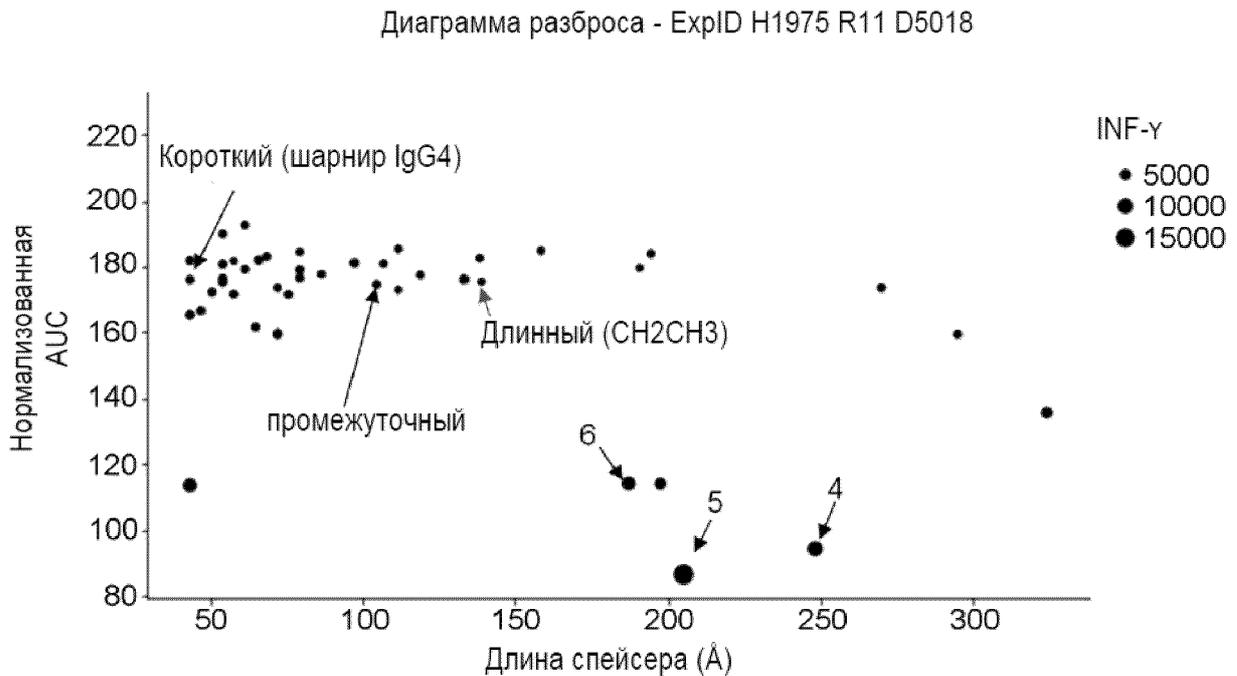


ФИГ. 53В

R11-CAR-T D5018 Графики рассеяния указывают на оптимальную длину спейсера для R11, равную $\sim 200\text{\AA}$

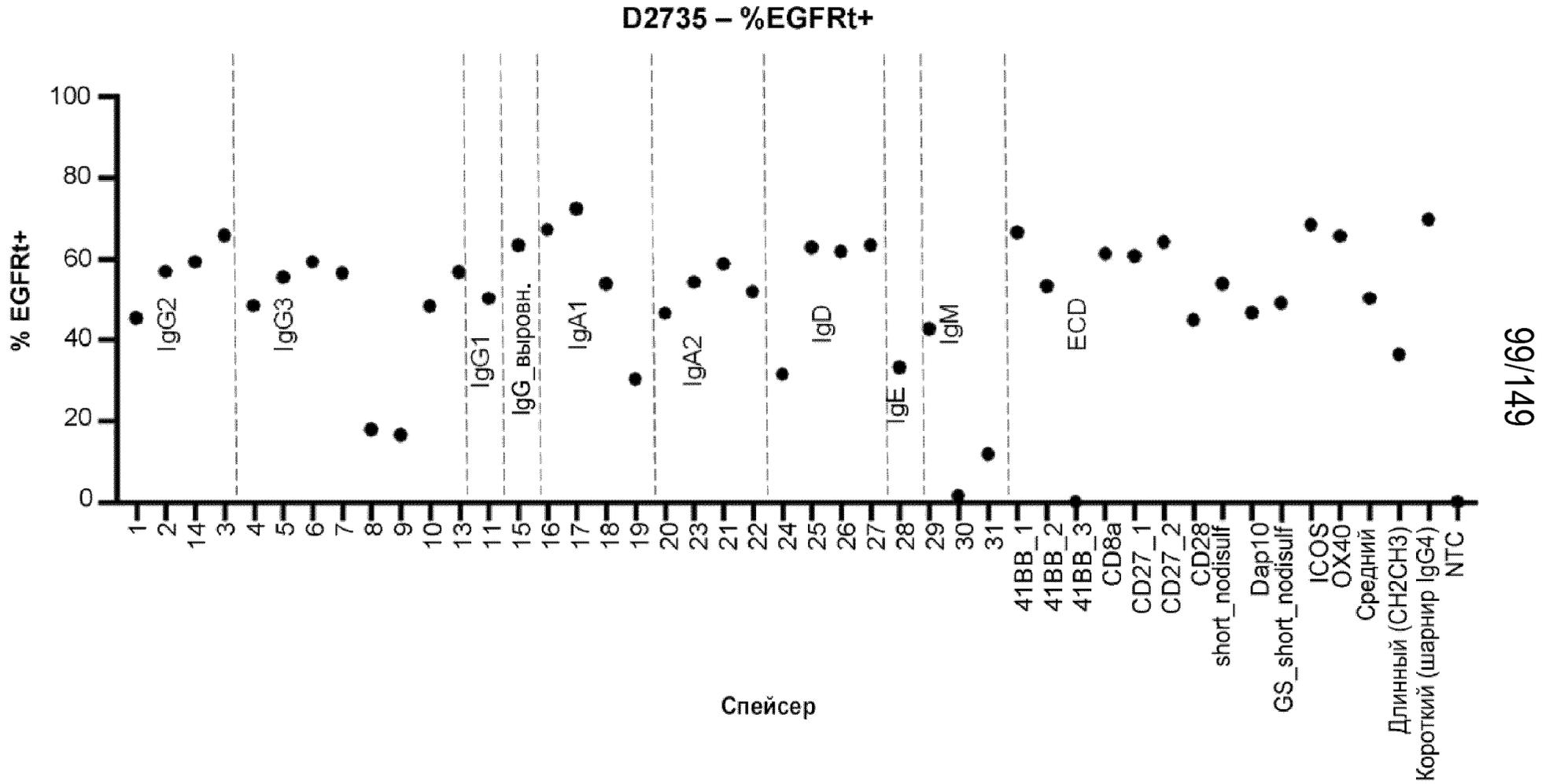


ФИГ. 54А



ФИГ. 54В

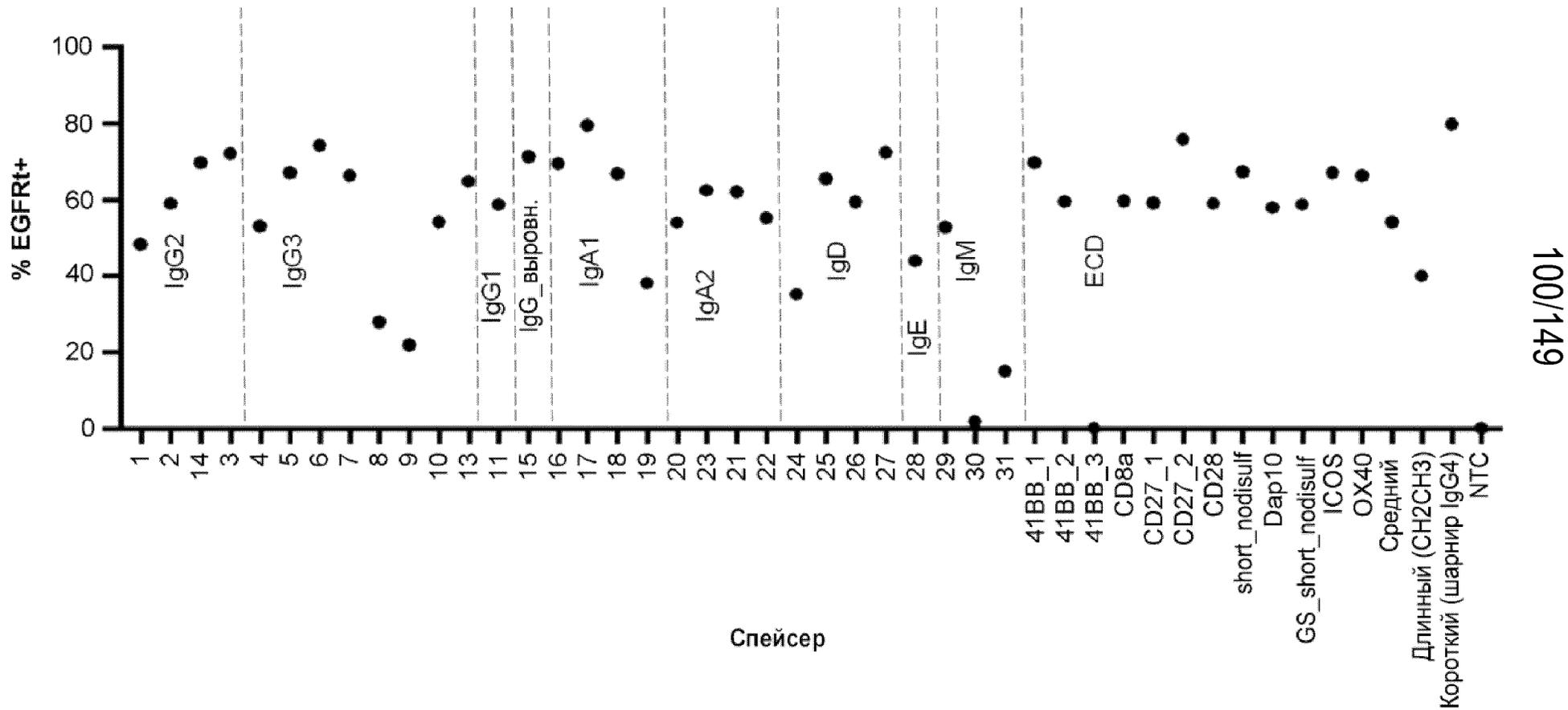
Эффективность трансдукции CAR R12 для Донора 1 и 2



ФИГ. 55А

Эффективность трансдукции CAR R12 для Донора 1 и 2

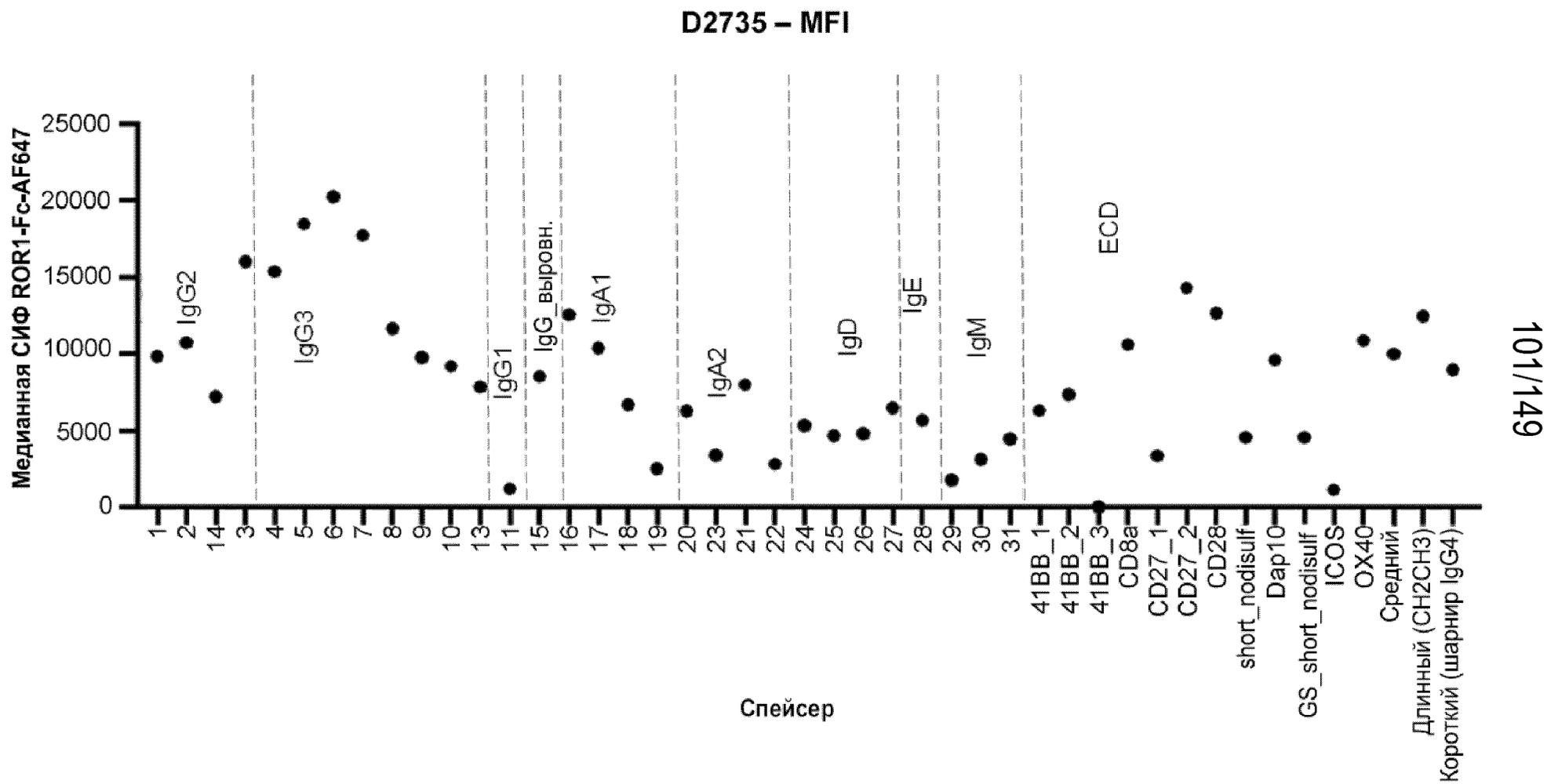
D5018 – %EGFRt+



100/149

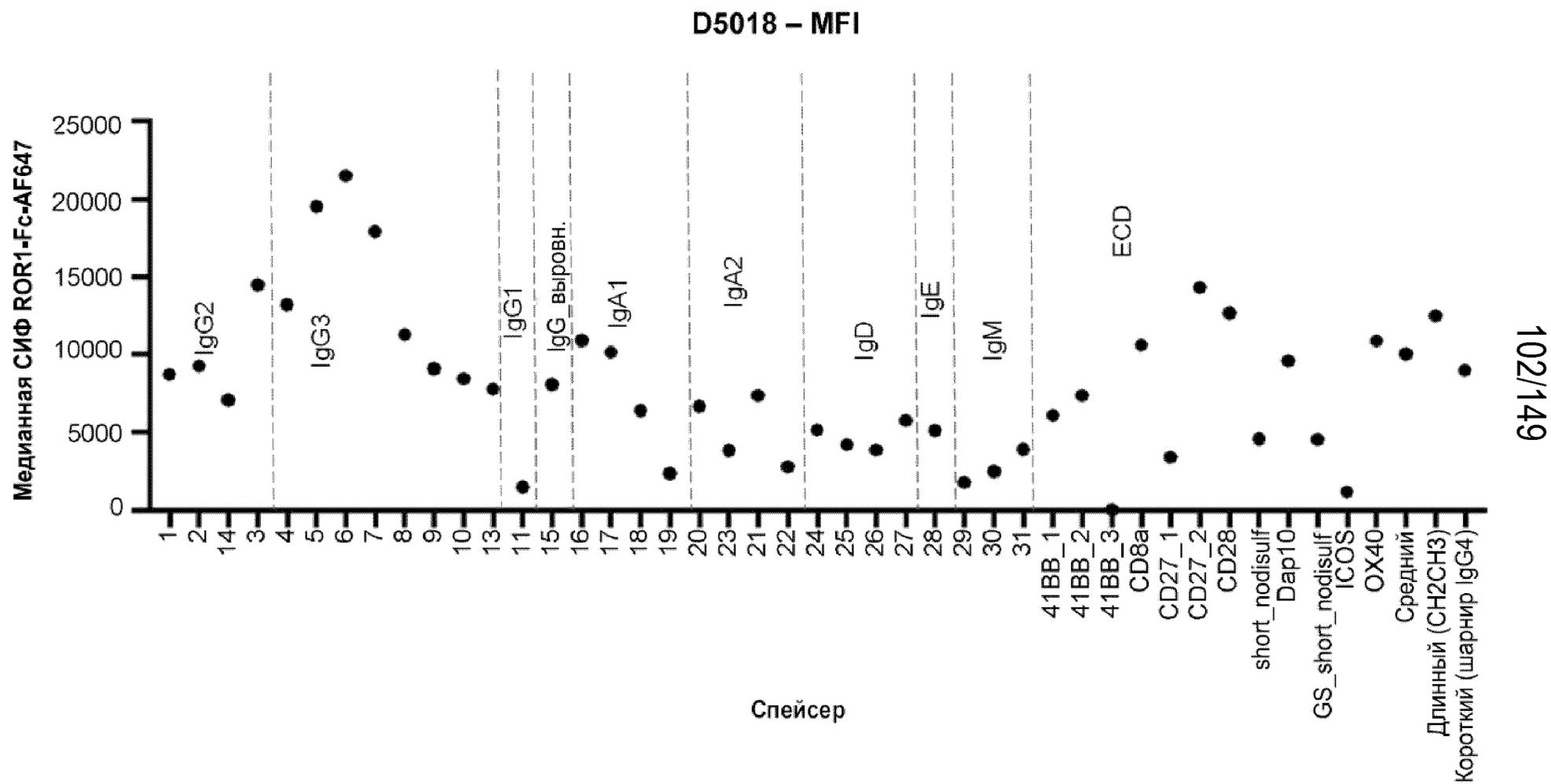
ФИГ. 55В

Эффективность трансдукции CAR R12 для Донора 1 и 2



ФИГ. 55С

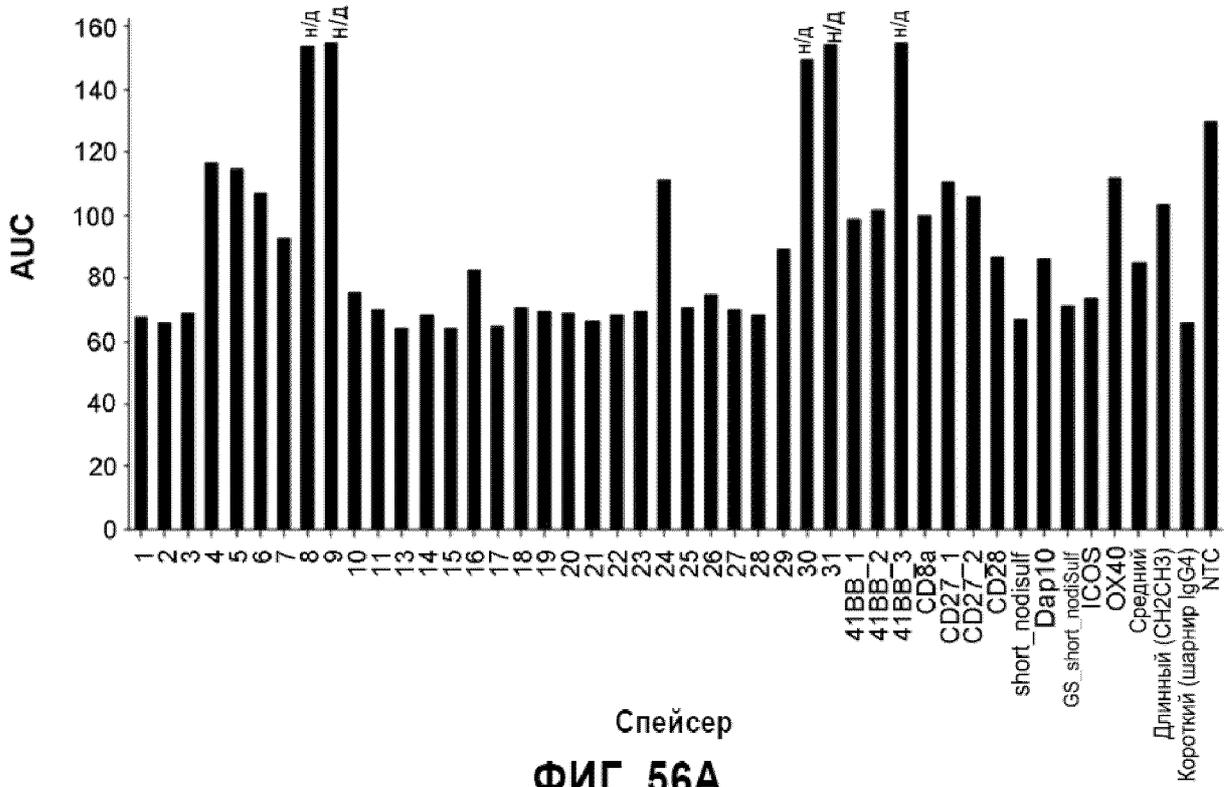
Эффективность трансдукции CAR R12 для Донора 1 и 2



ФИГ. 55D

Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D2735: A549-NLR 1:1

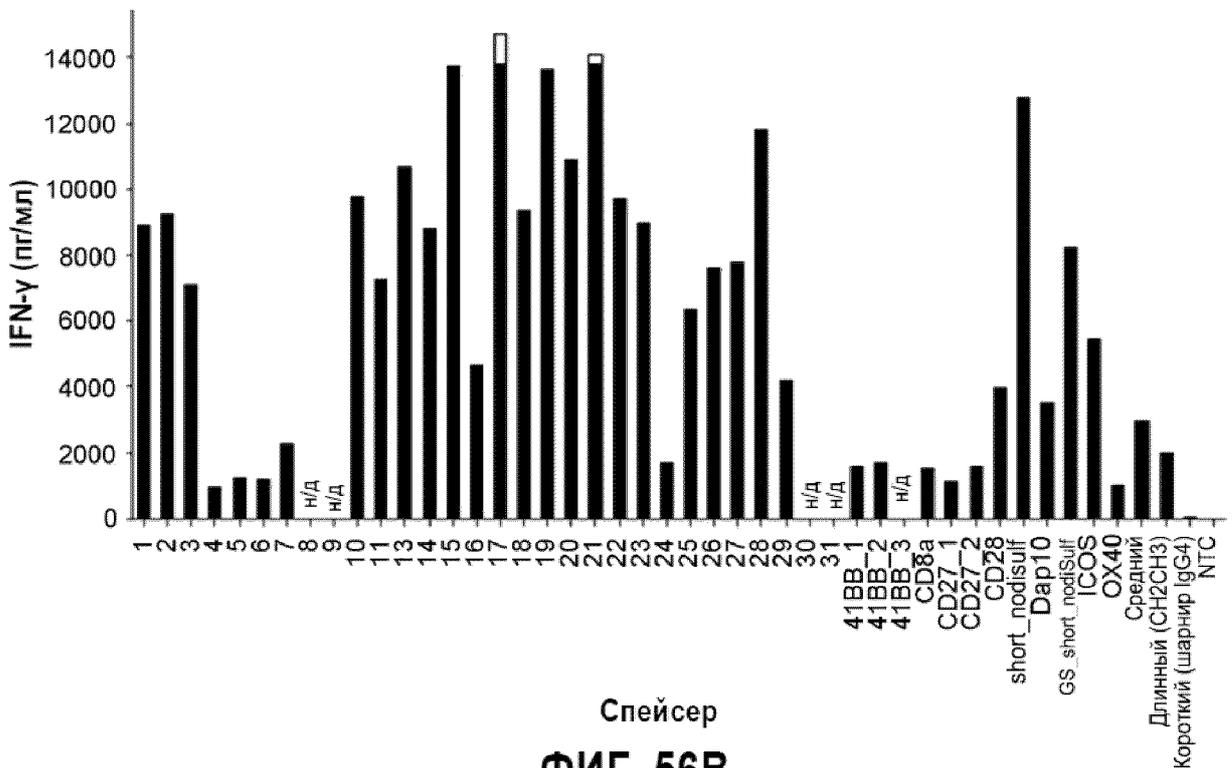
AUC - Связывающий компонент R12 - Донор 2735 - целевые A549



ФИГ. 56А

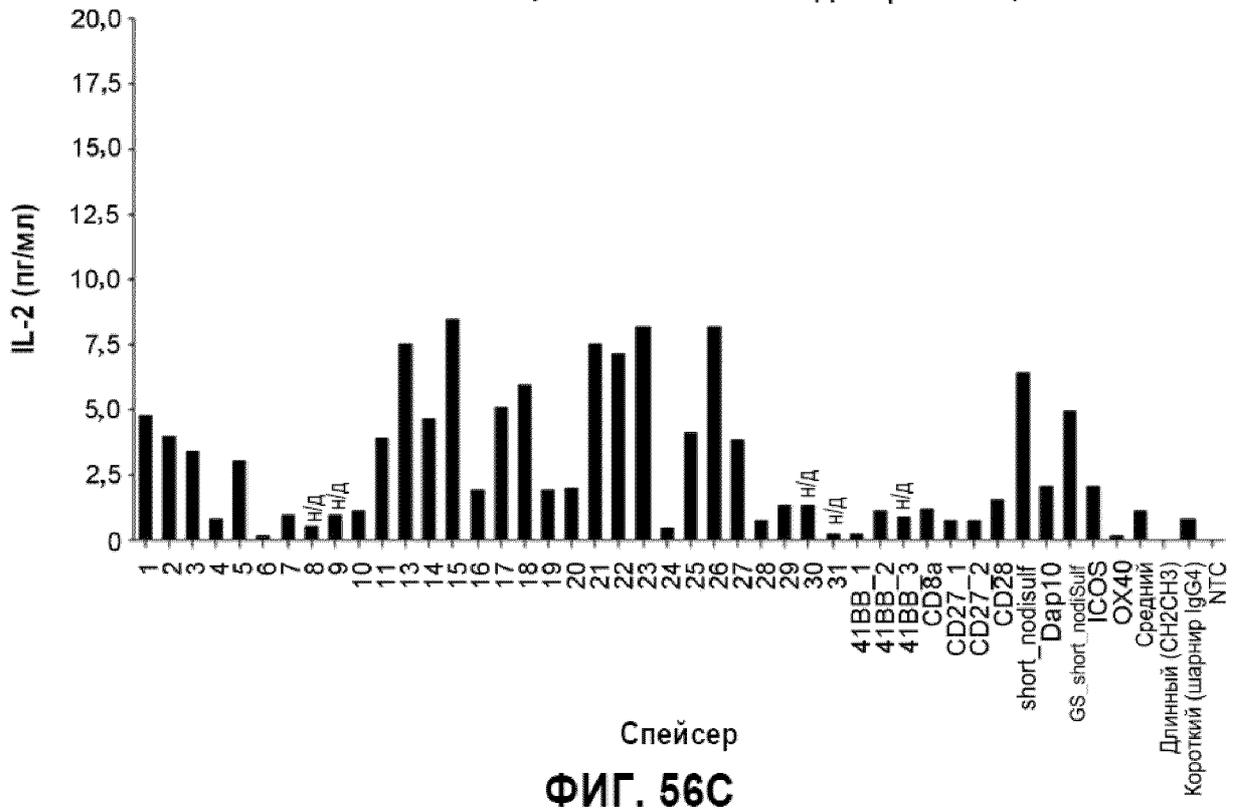
Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D2735: A549-NLR 1:1

MSD - Связывающий компонент R12 - Донор 2735 - целевые A549



ФИГ. 56В

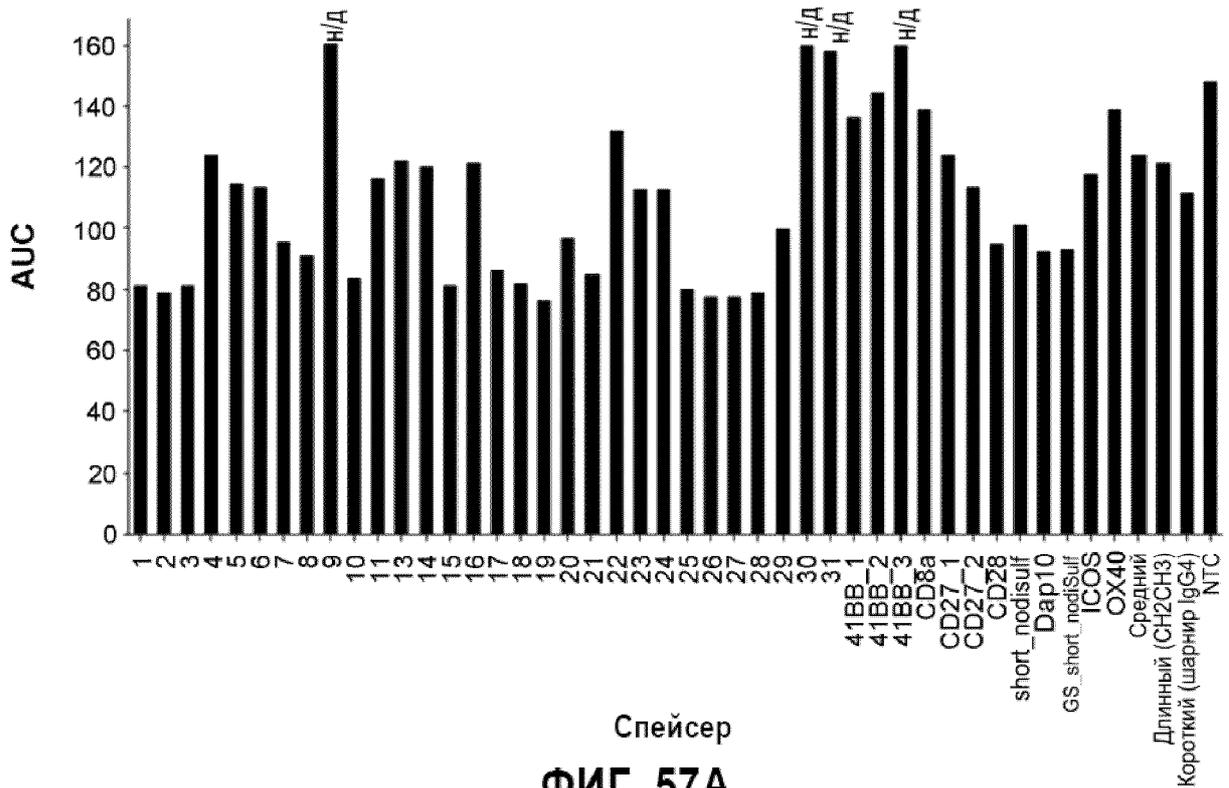
MSD - Связывающий компонент R12 - Донор 2735 - целевые A549



Спейсер
ФИГ. 56С

Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D5018: A549-NLR 1:1

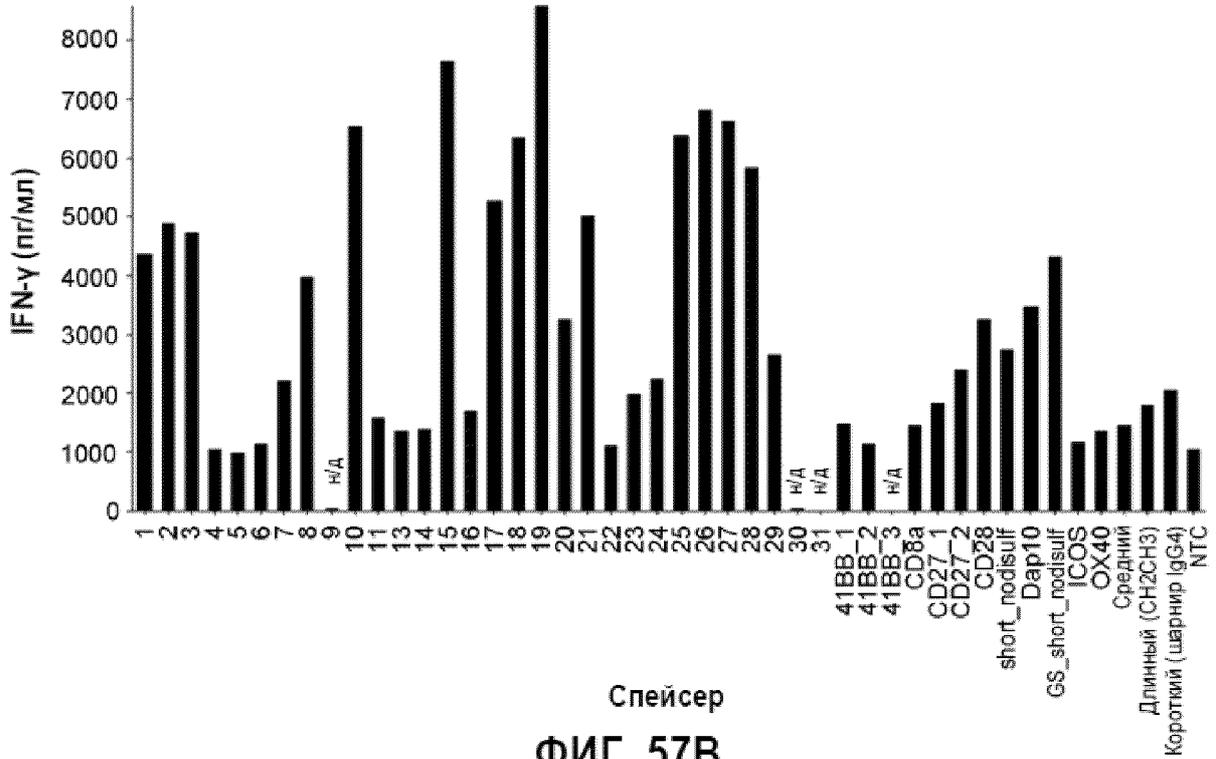
AUC - Связывающий компонент R12 - Донор 5018 - целевые A549



Спейсер
ФИГ. 57А

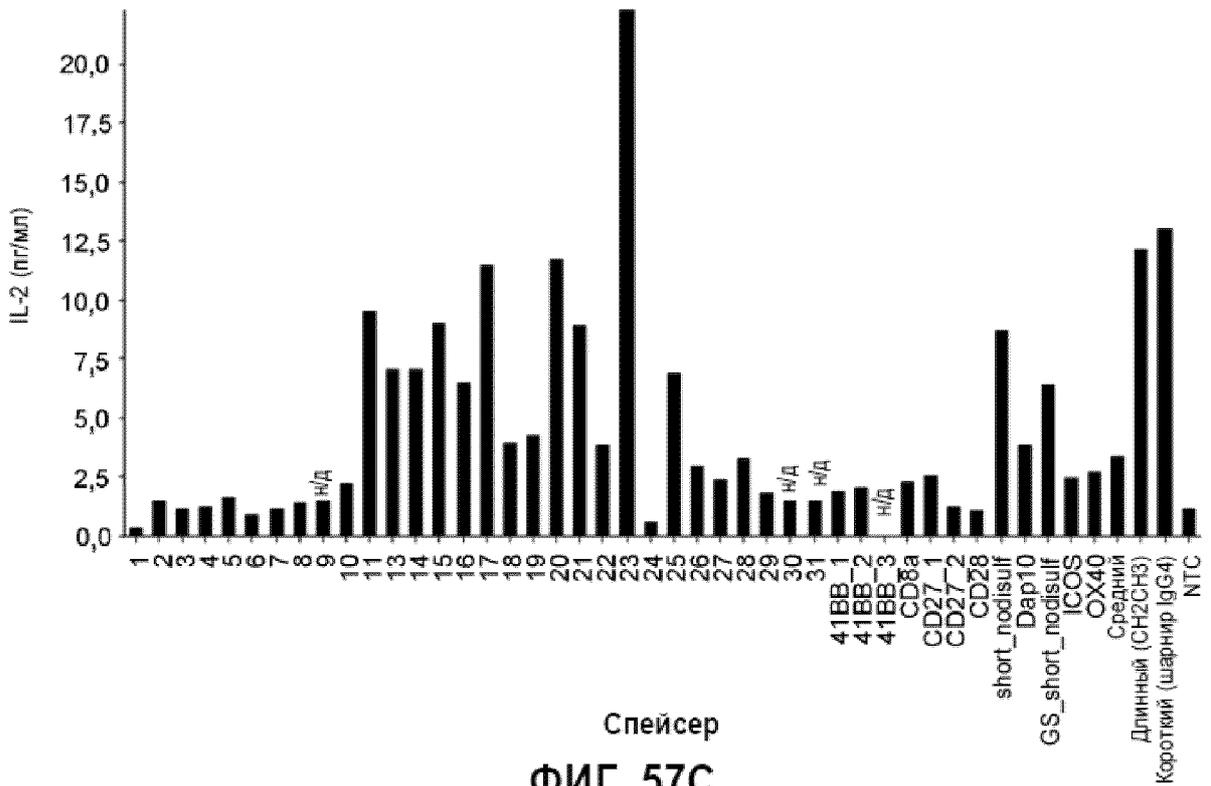
Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D5018: A549-NLR 1:1

MSD - Связывающий компонент R12 - Донор 5018 - целевые A549



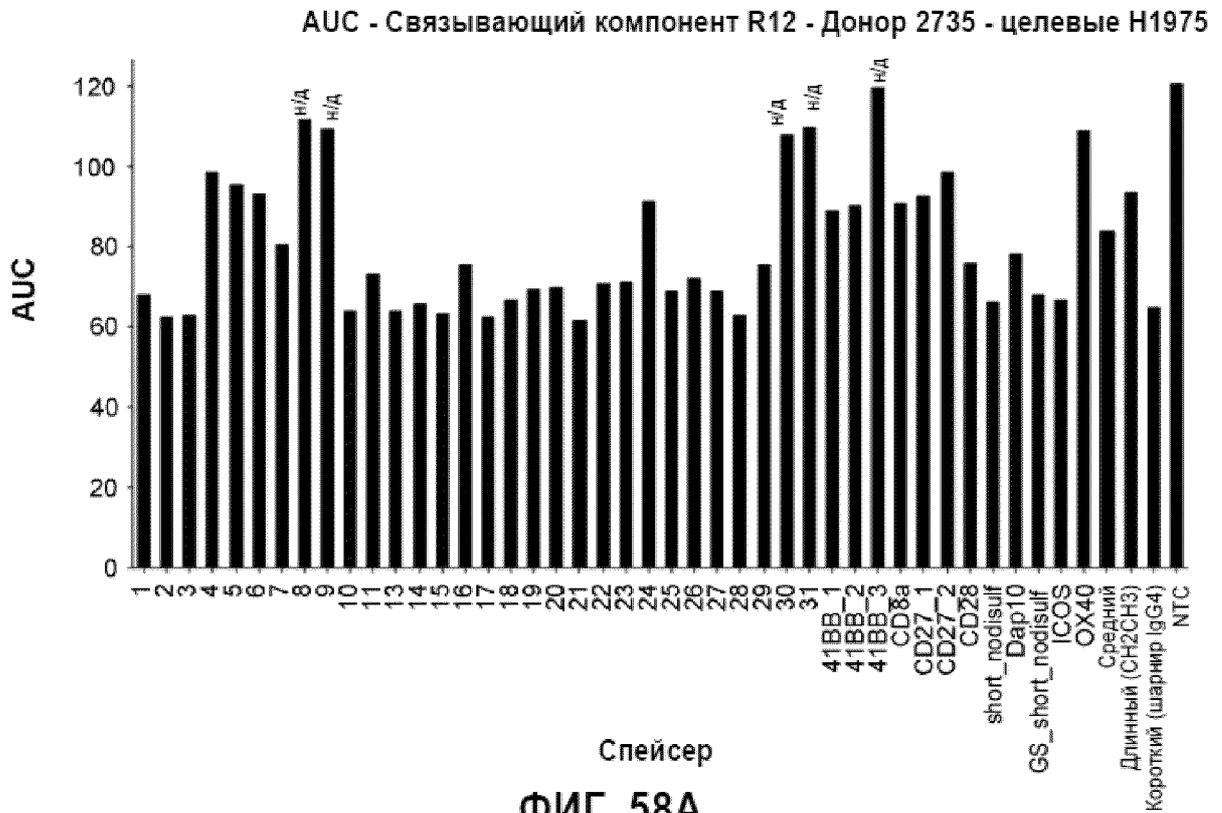
ФИГ. 57В

MSD - Связывающий компонент R12 - Донор 5018 - целевые A549

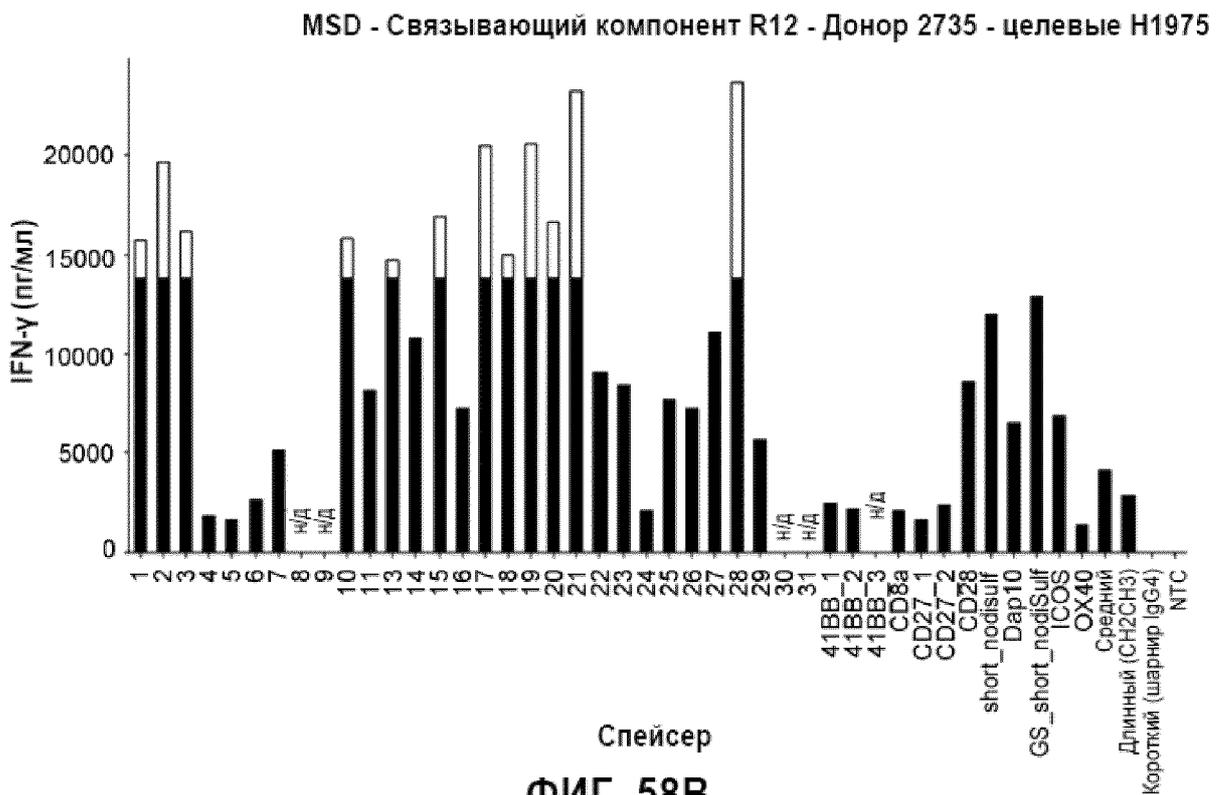


ФИГ. 57С

Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D2735: H1975-NLR 1:1

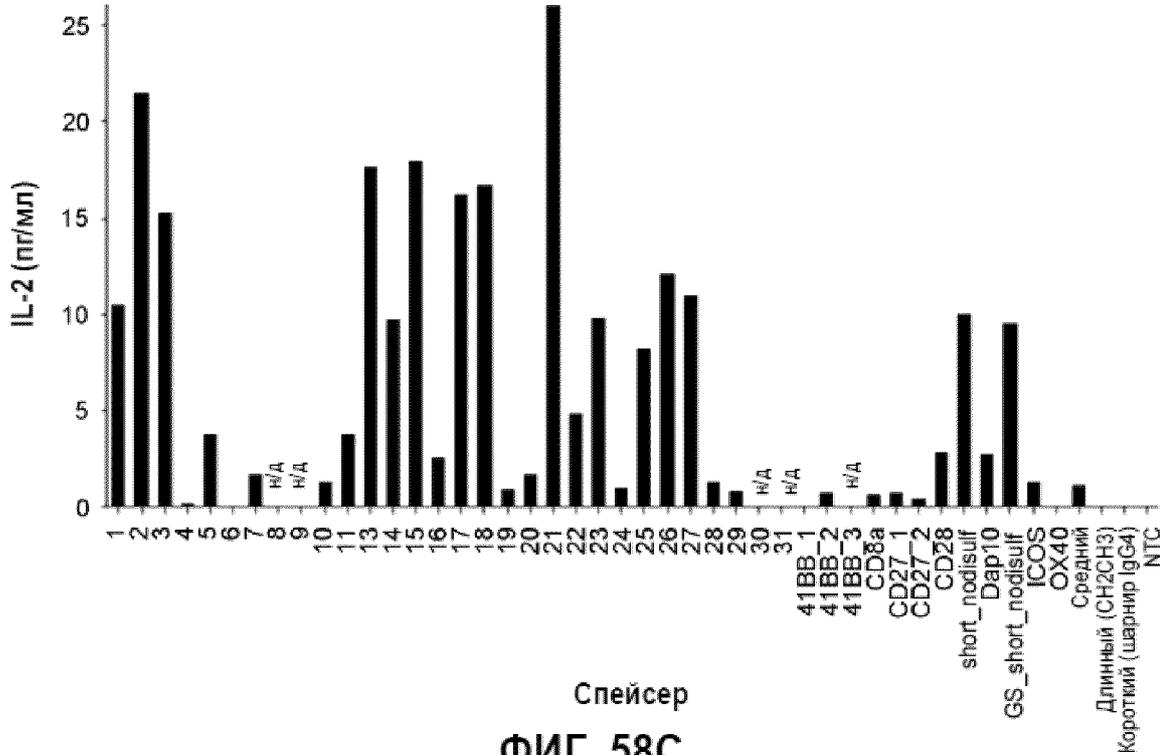


Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D2735: H1975-NLR 1:1



107/149

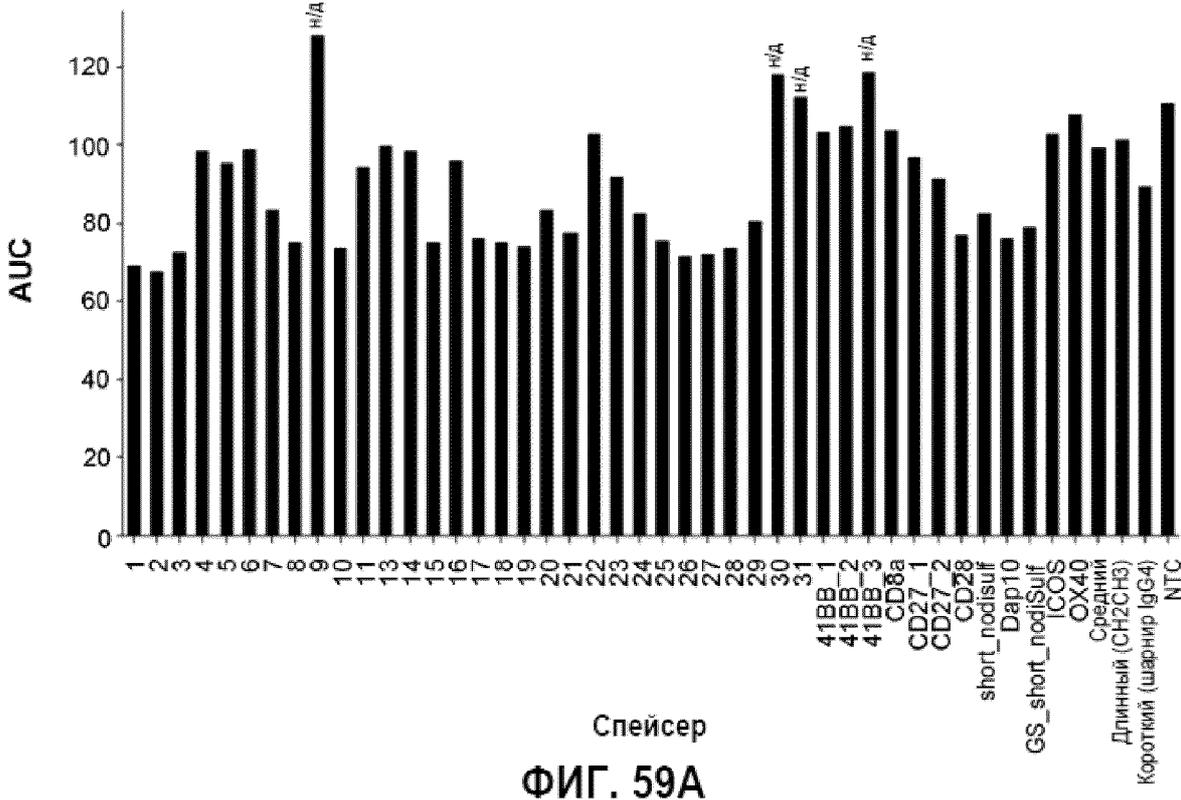
MSD - Связывающий компонент R12 - Донор 2735 - целевые H1975



ФИГ. 58С

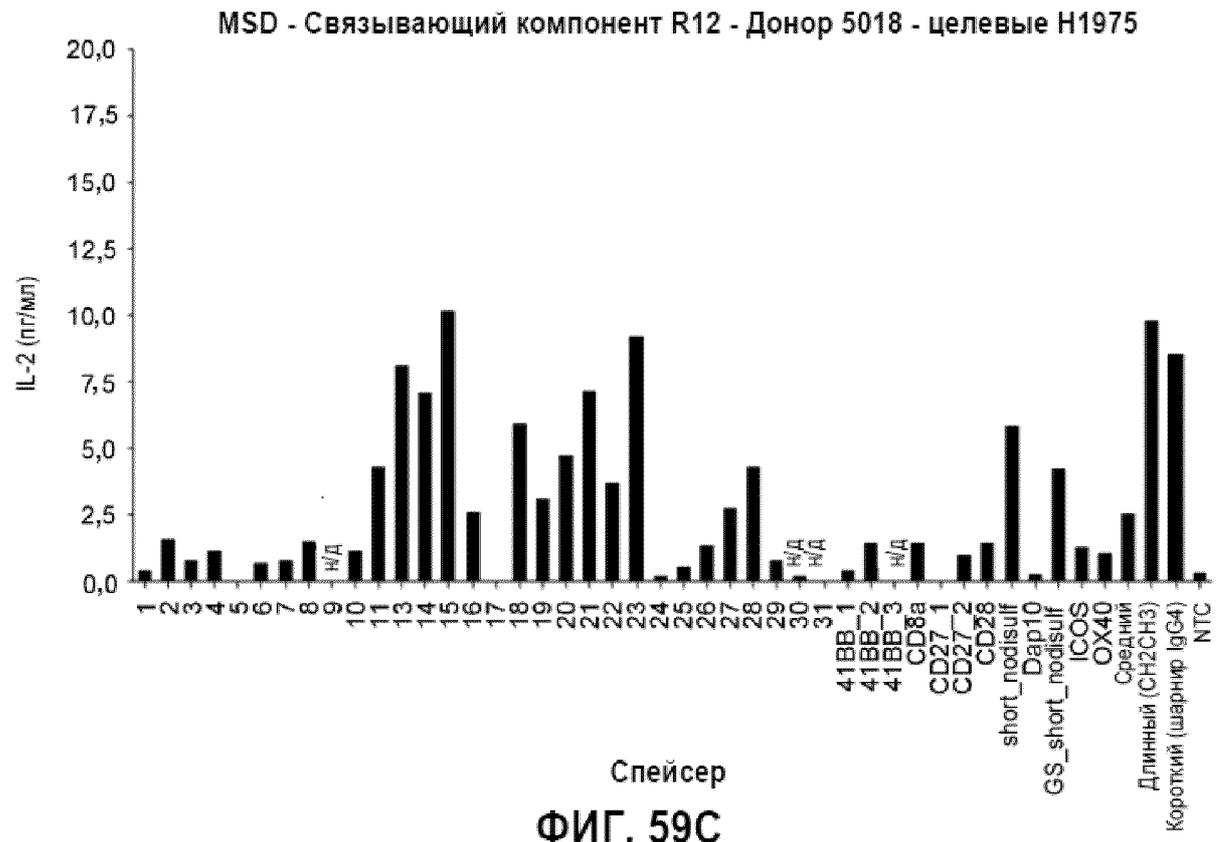
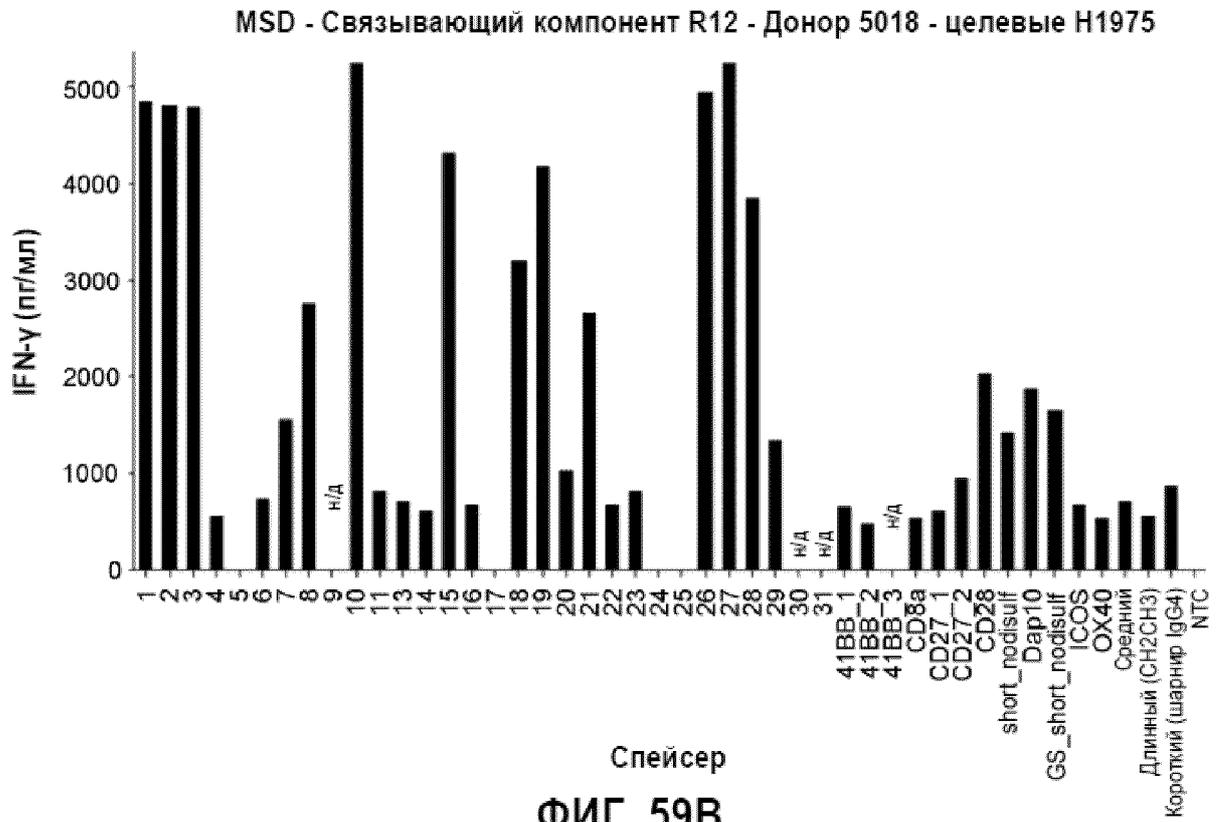
Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D5018: H1975-NLR 1:1

AUC - Связывающий компонент R12 - Донор 5018 - целевые H1975



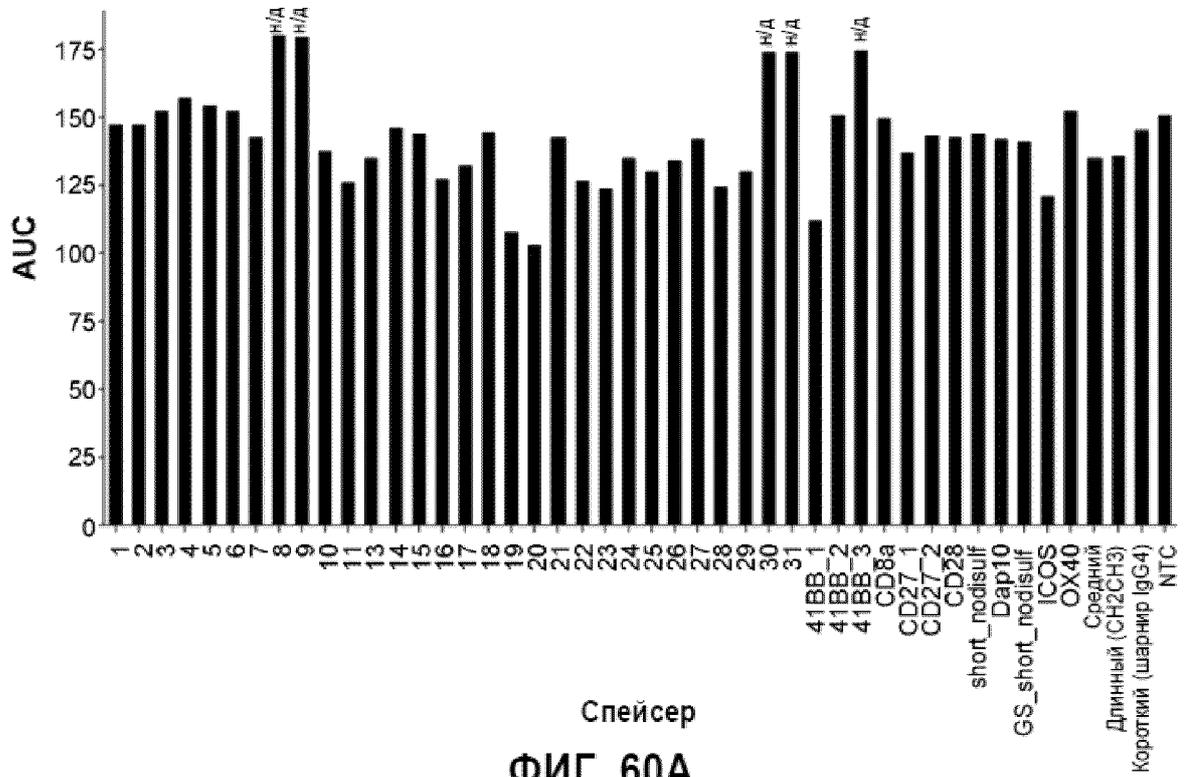
ФИГ. 59А

Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D5018: H1975-NLR 1:1



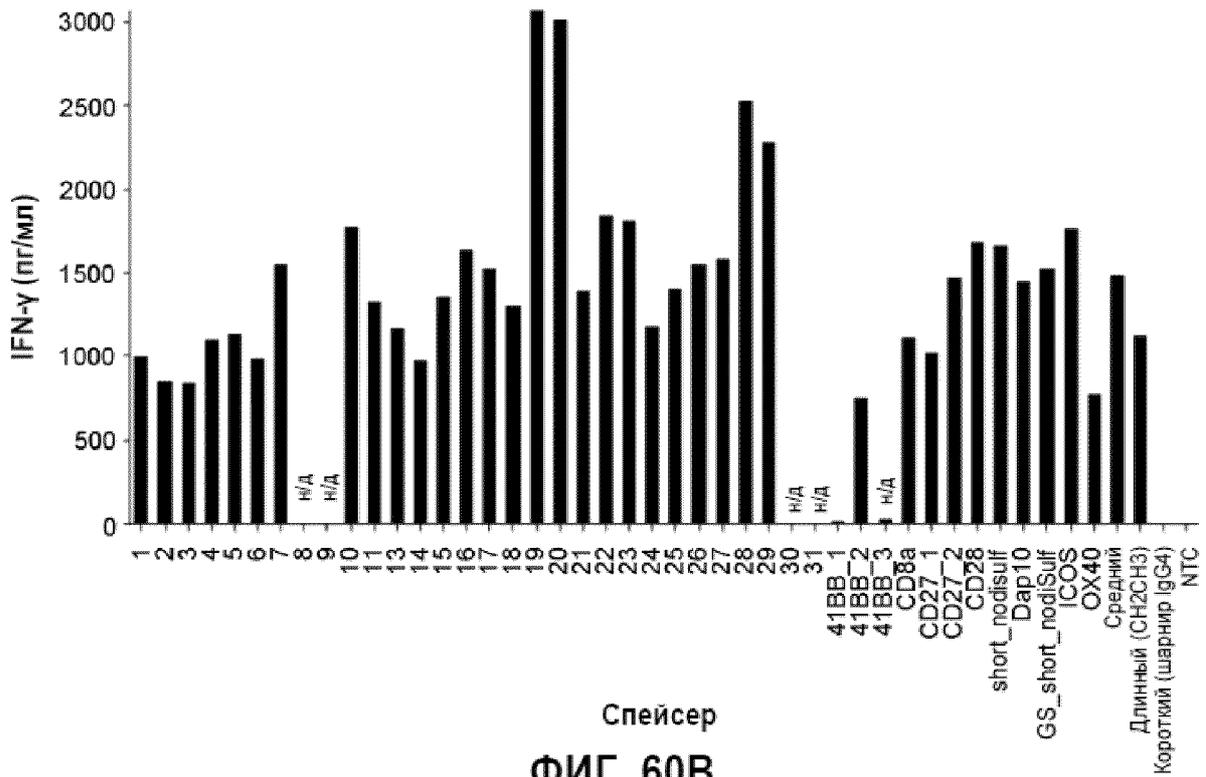
Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D2735: A549-ROR1KO-NLR 1:1

AUC - Связывающий компонент R12 - Донор 2735 - КО по мишени



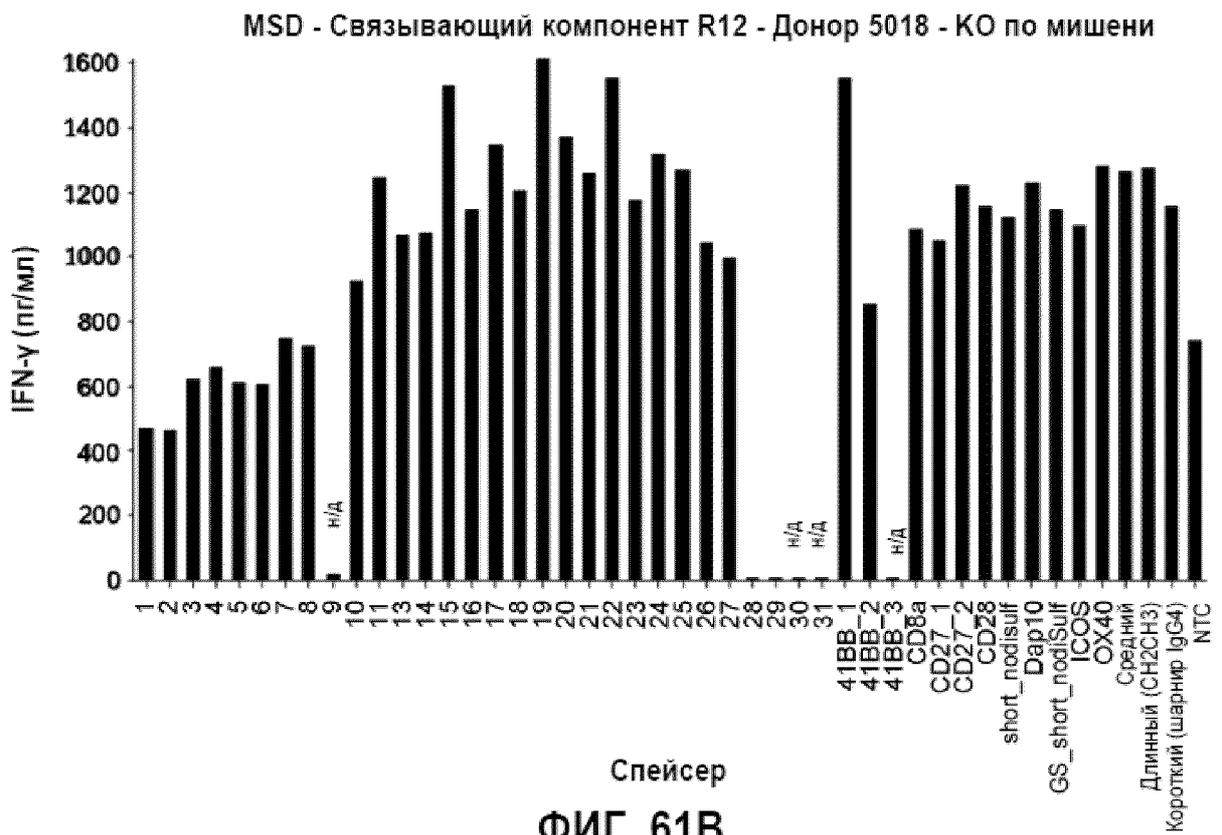
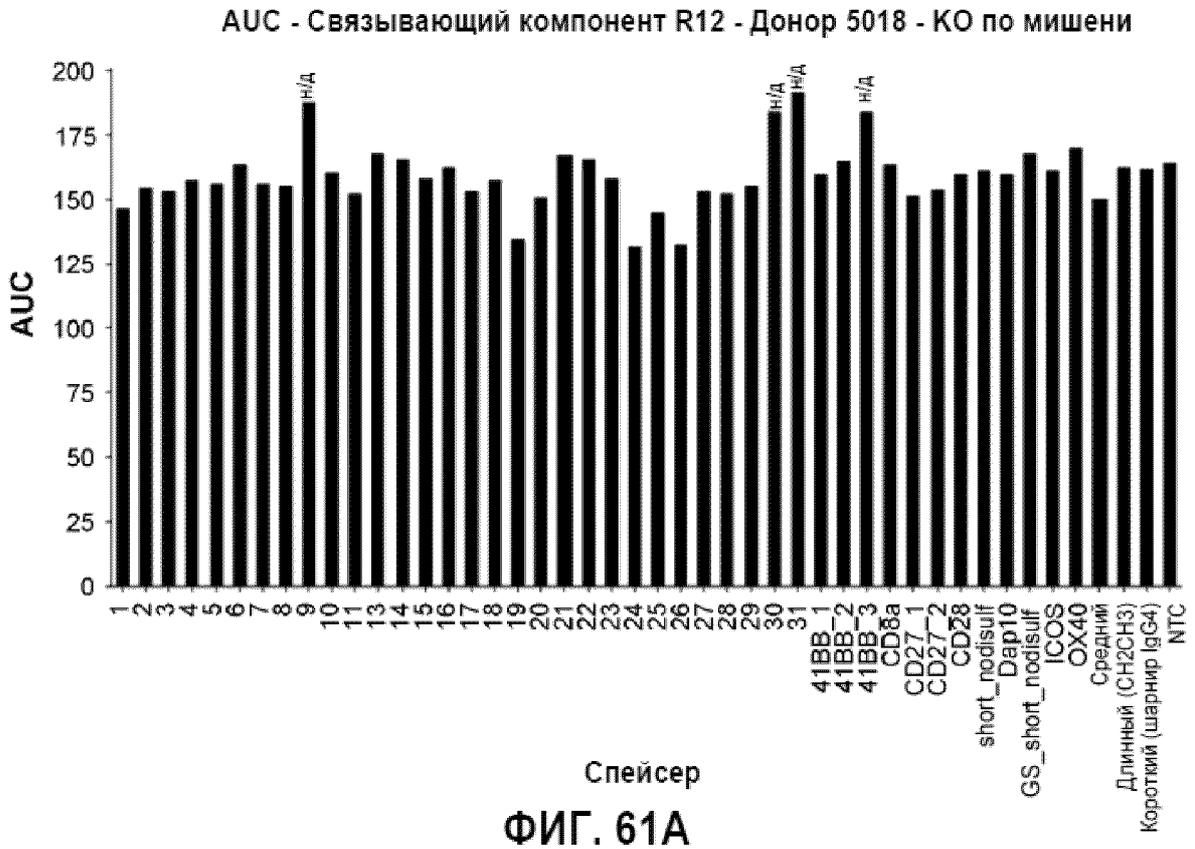
ФИГ. 60А

MSD - Связывающий компонент R12 - Донор 2735 - КО по мишени



ФИГ. 60В

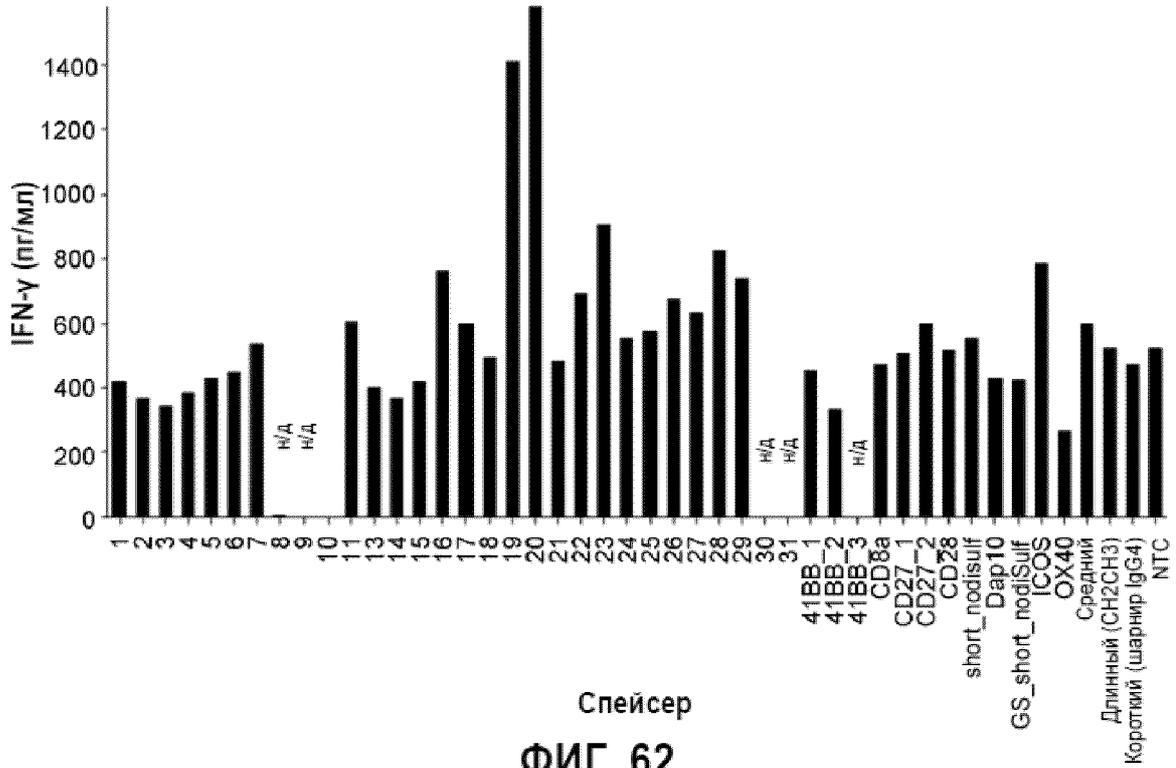
Первичное уничтожение и AUC R12-CAR-T D5018: A549-ROR1KO-NLR 1:1



111/149

Независимые от мишени цитокины для R12-CAR-T D2735

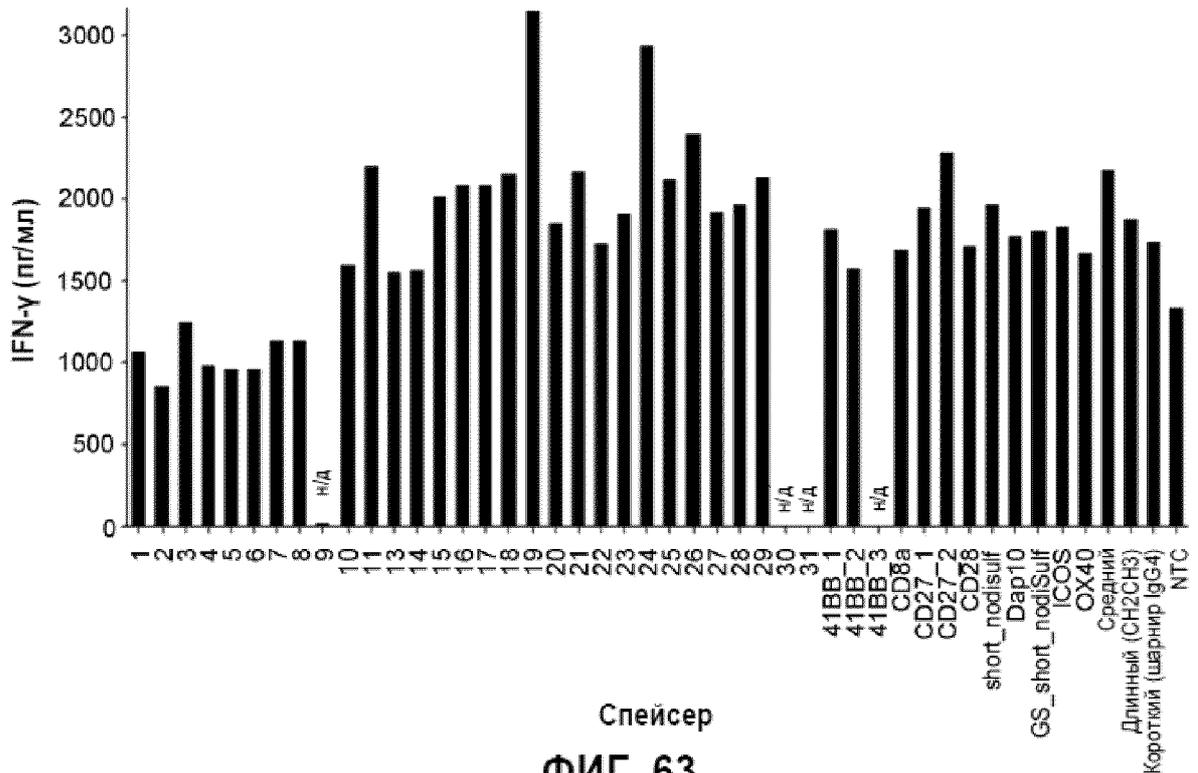
MSD - Связывающий компонент R12 - Донор 2735 - NONE по мишени



Спейсер
ФИГ. 62

Независимые от мишени цитокины для R12-CAR-T D5018

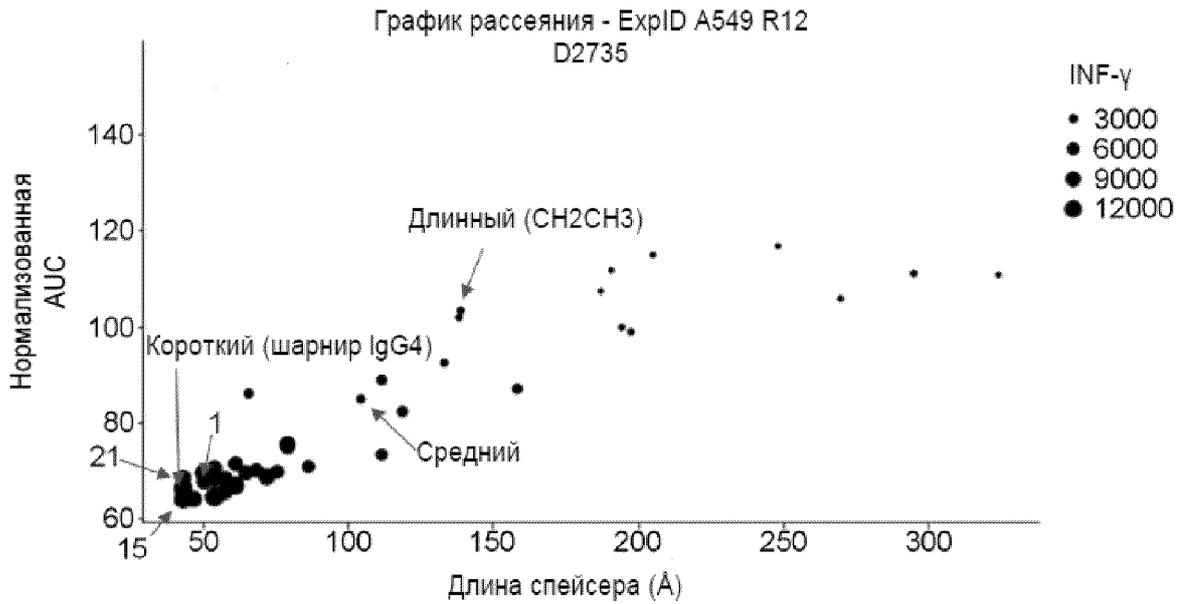
MSD - Связывающий компонент R12 - Донор 5018 - NONE по мишени



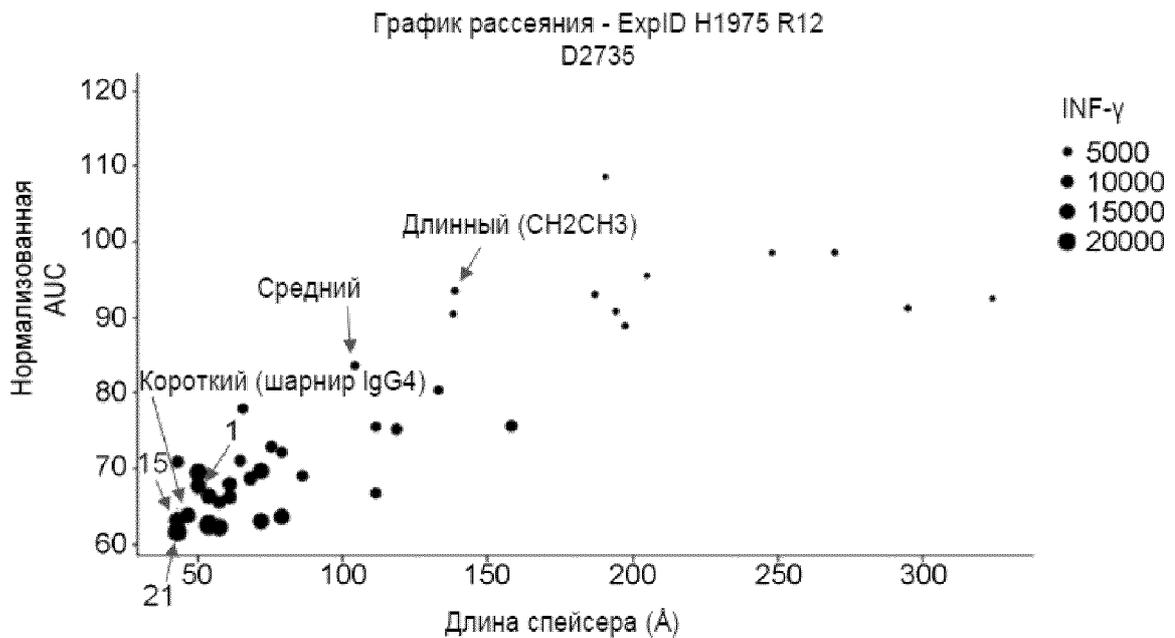
Спейсер
ФИГ. 63

112/149

R12-CAR-T D2735 Графики рассеяния указывают на оптимальную длину спейсера для R12, равную ~45Å

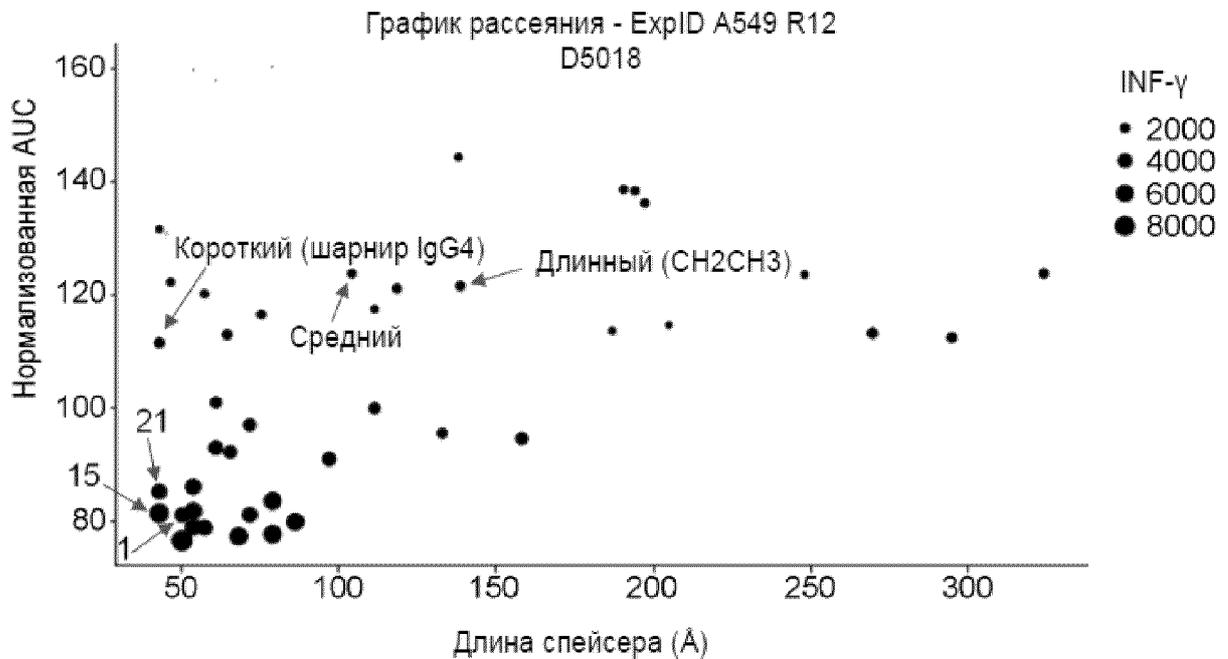


ФИГ. 64А

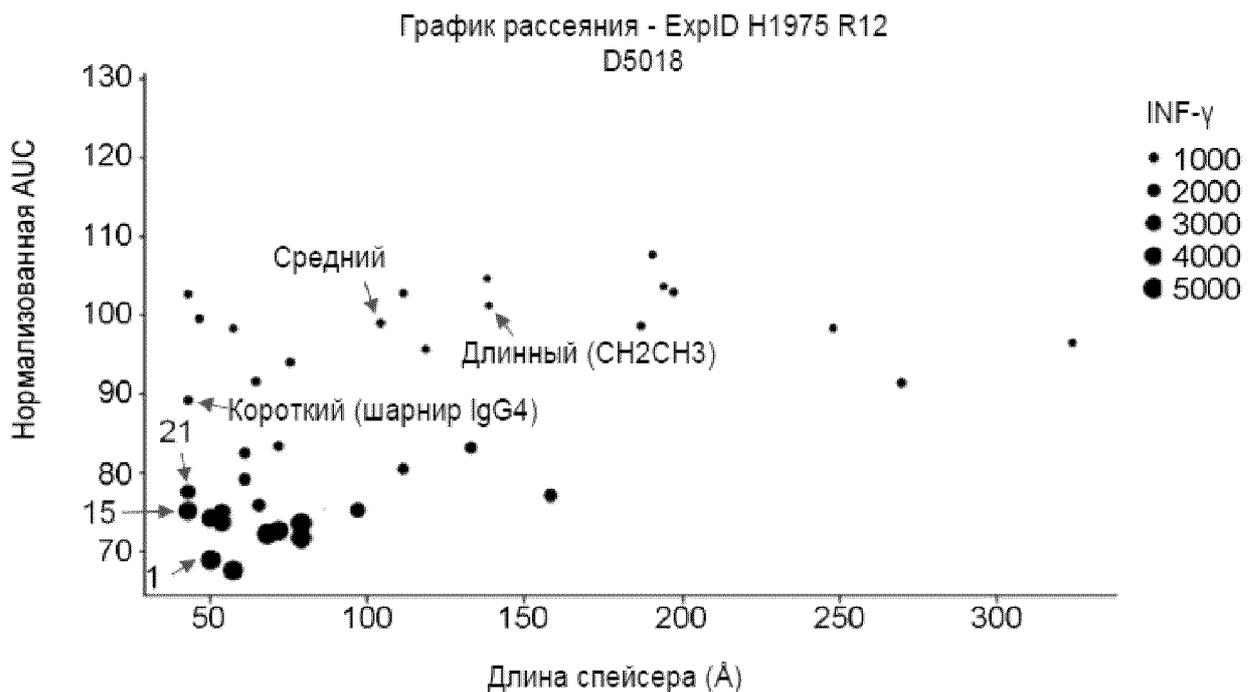


ФИГ. 64В

R12-CAR-T D5018 Графики рассеяния указывают на оптимальную длину спейсера для R12, равную ~45Å

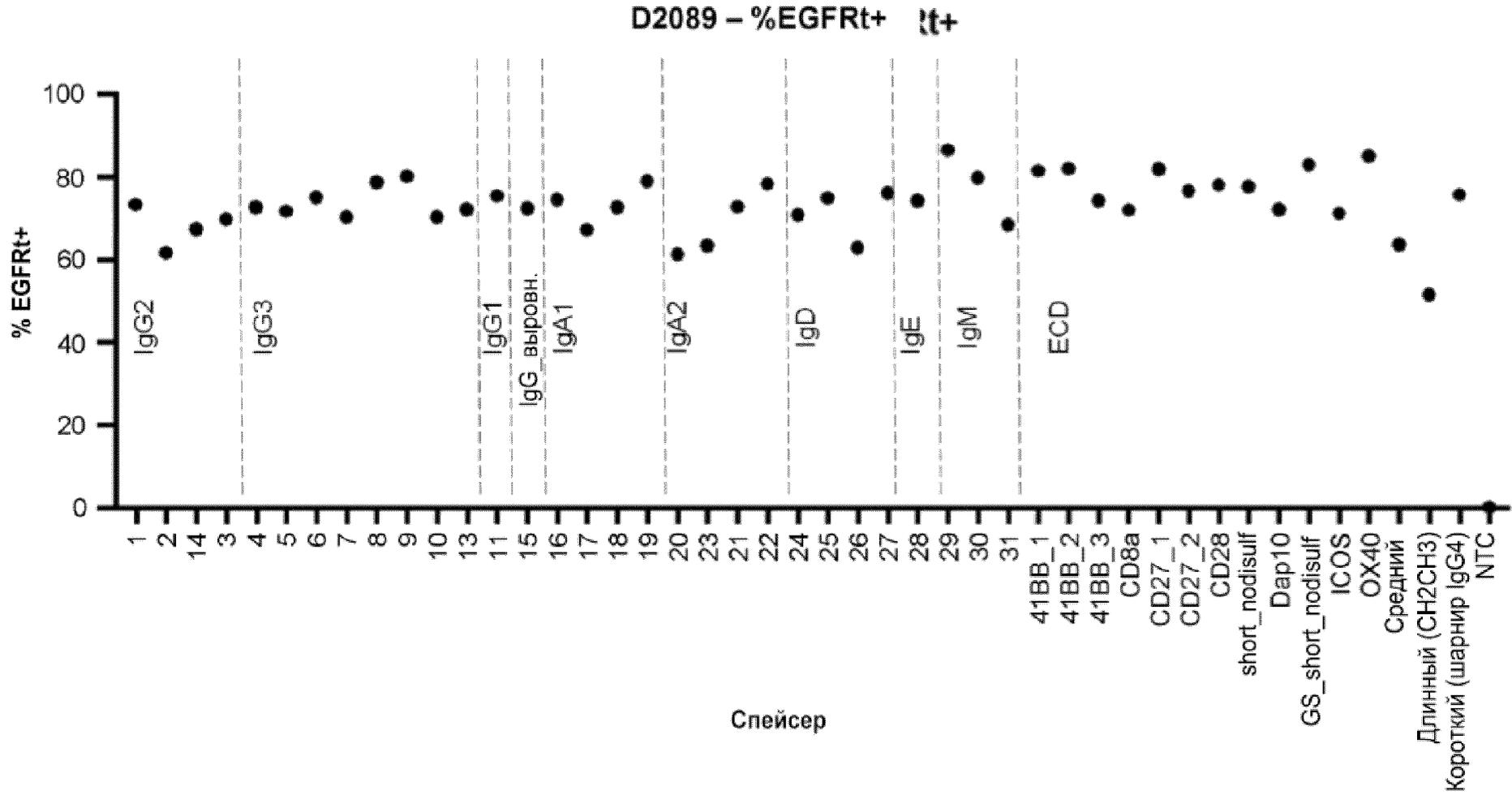


ФИГ. 65А



ФИГ. 65В

Эффективность трансдукции CAR 2A2 для Донора 1 и 2

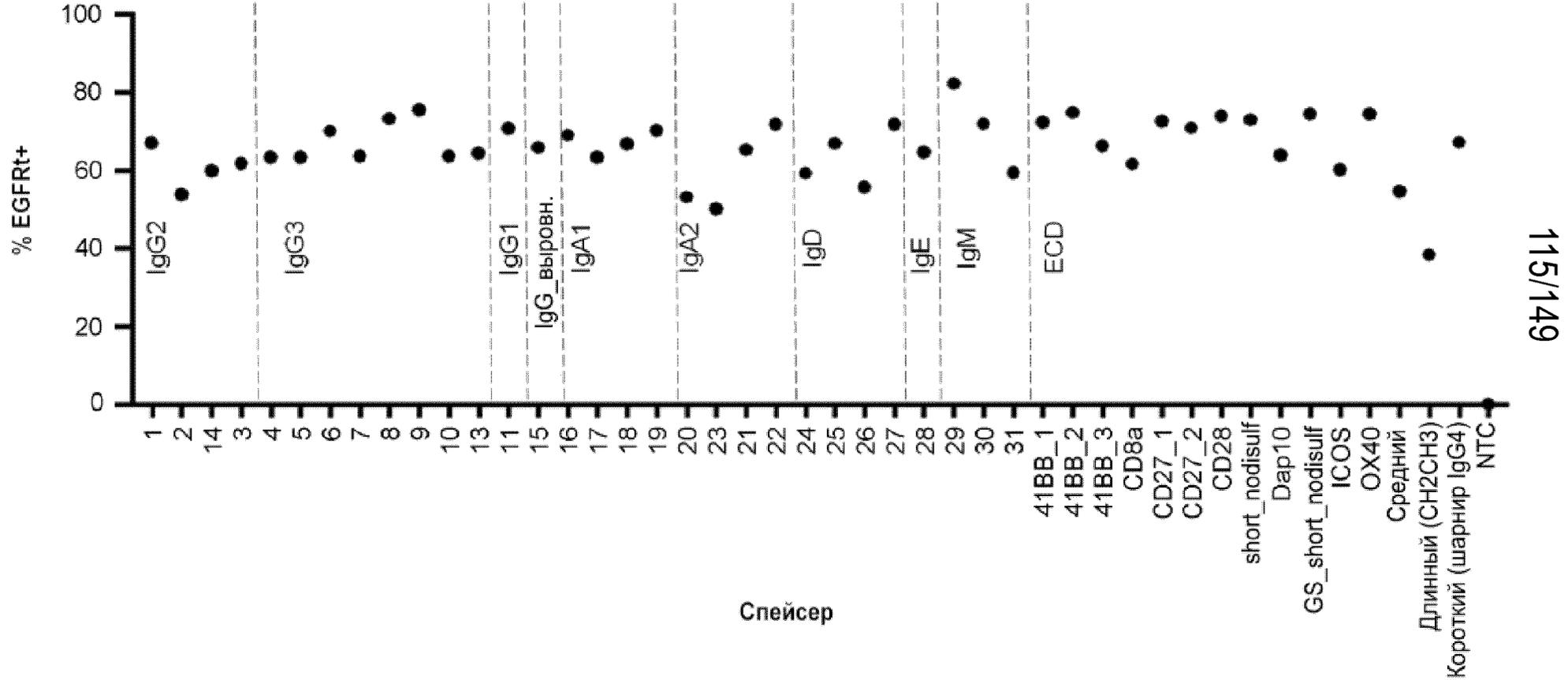


11/4/149

ФИГ. 66А

Эффективность трансдукции CAR 2A2 для Донора 1 и 2

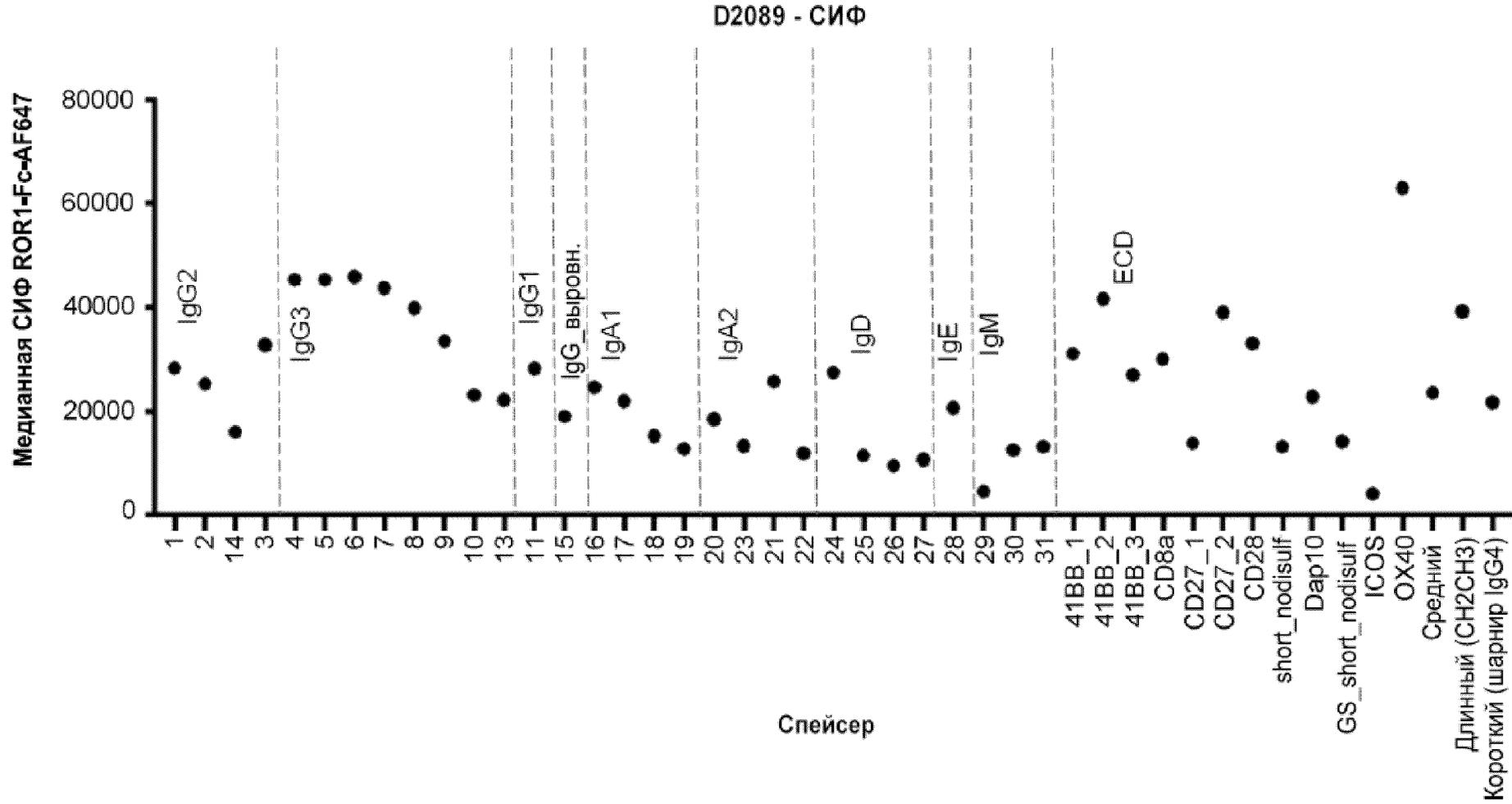
D5018 – %EGFRt+



ФИГ. 66В

115/149

Эффективность трансдукции CAR 2A2 для Донора 1 и 2

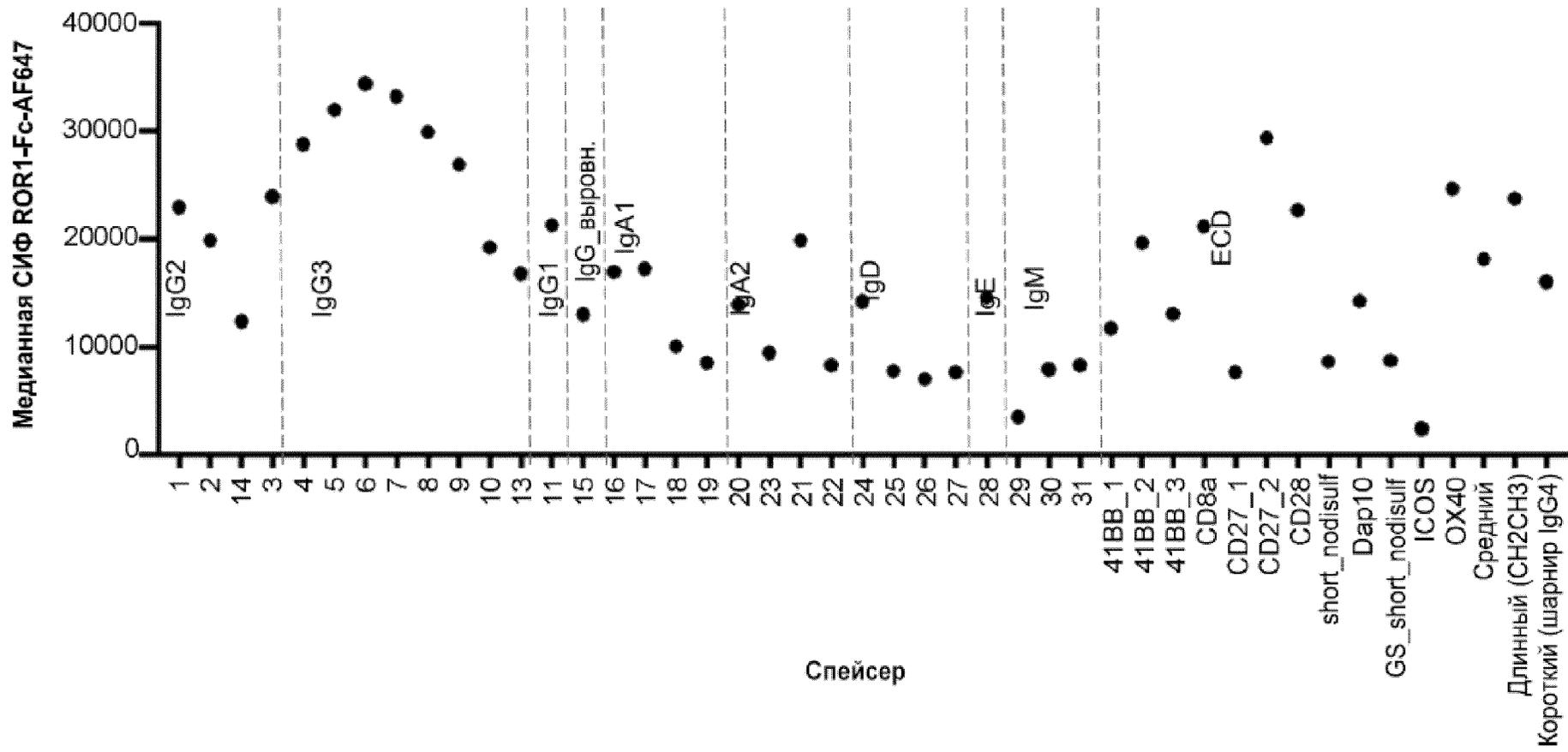


116/149

ФИГ. 66С

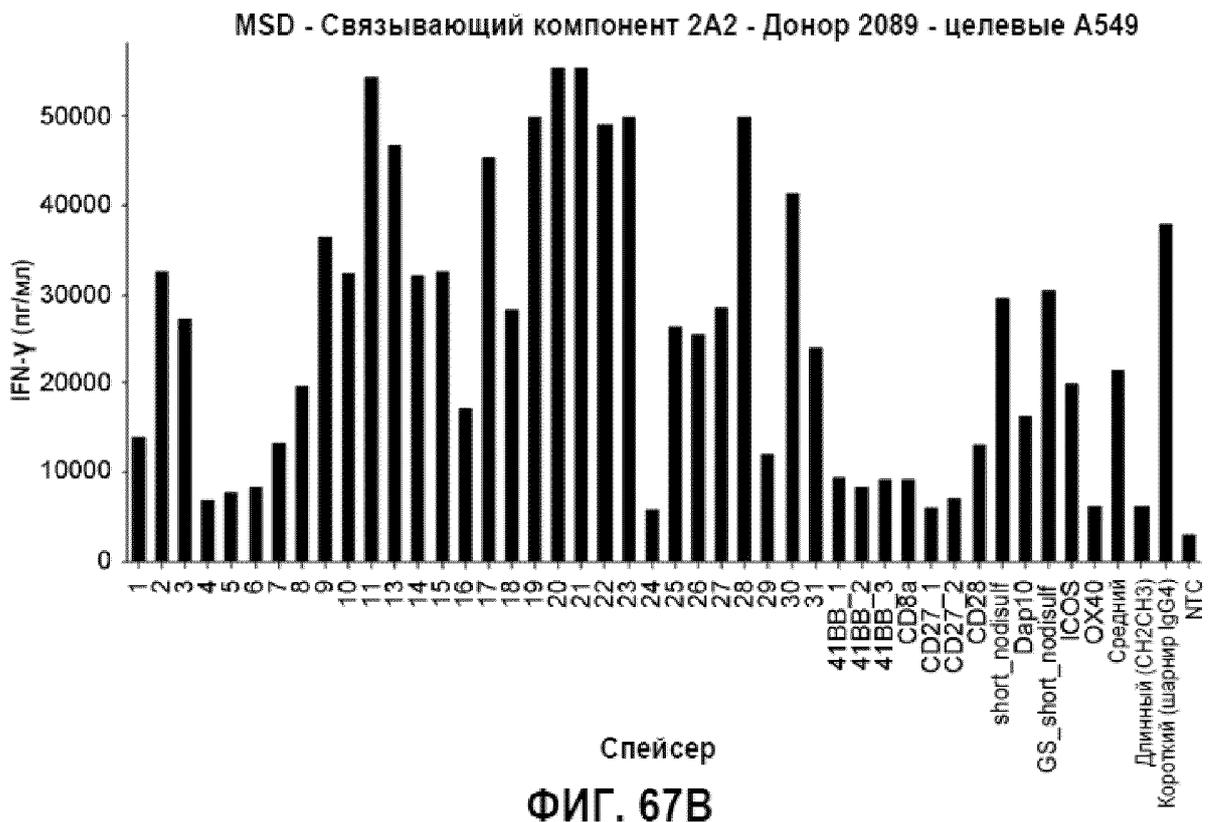
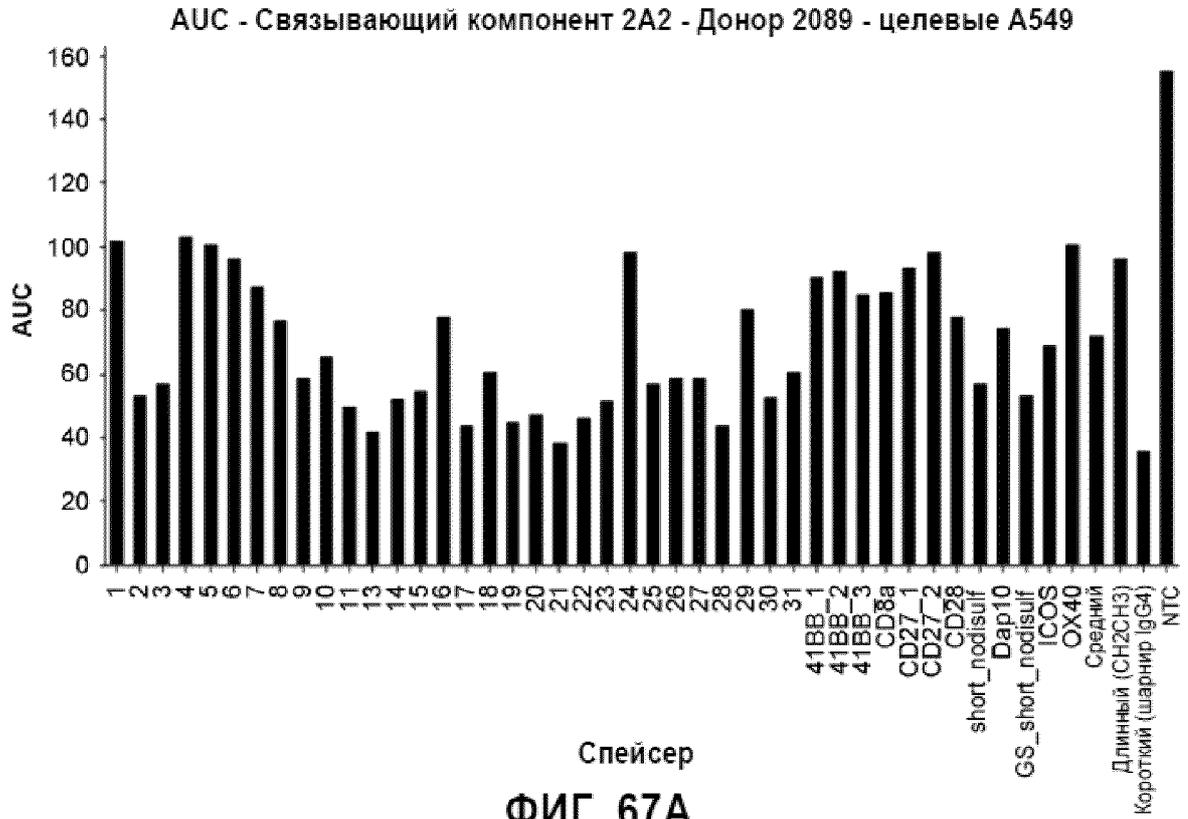
Эффективность трансдукции CAR 2A2 для Донора 1 и 2

D5018 - СИФ

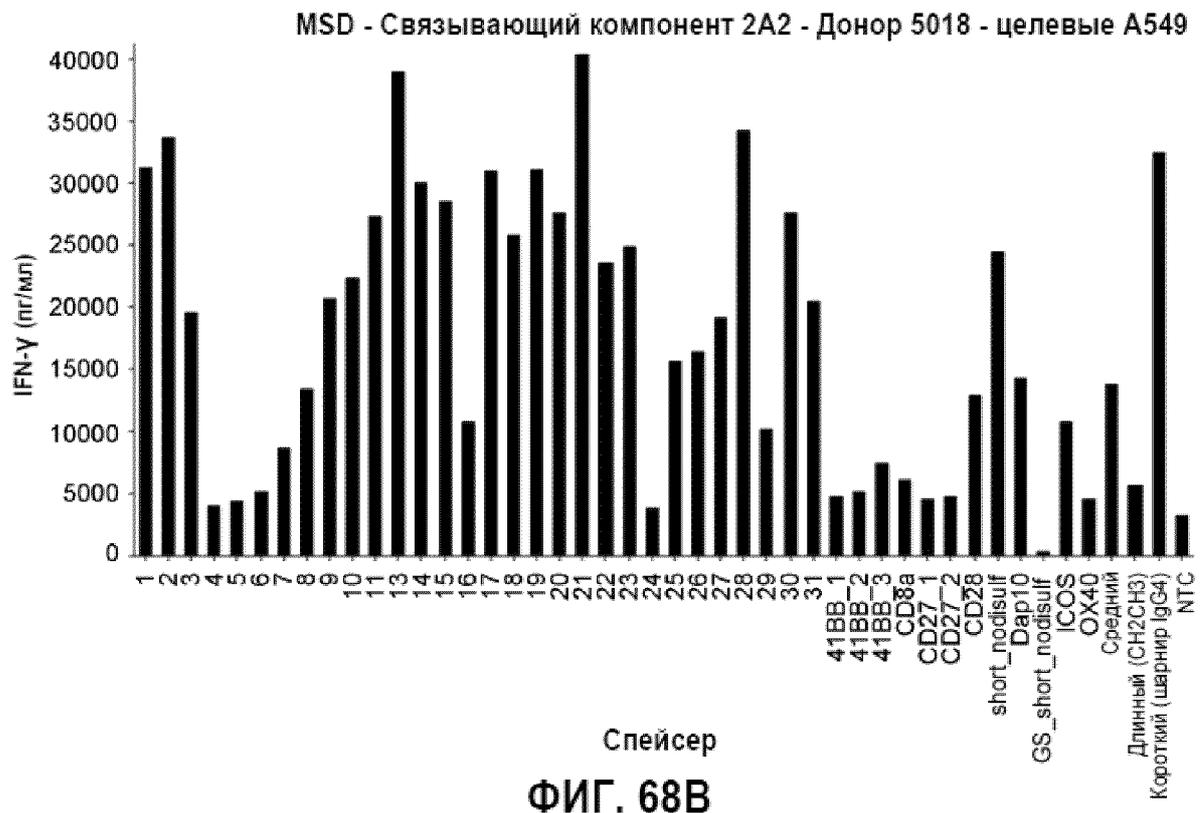
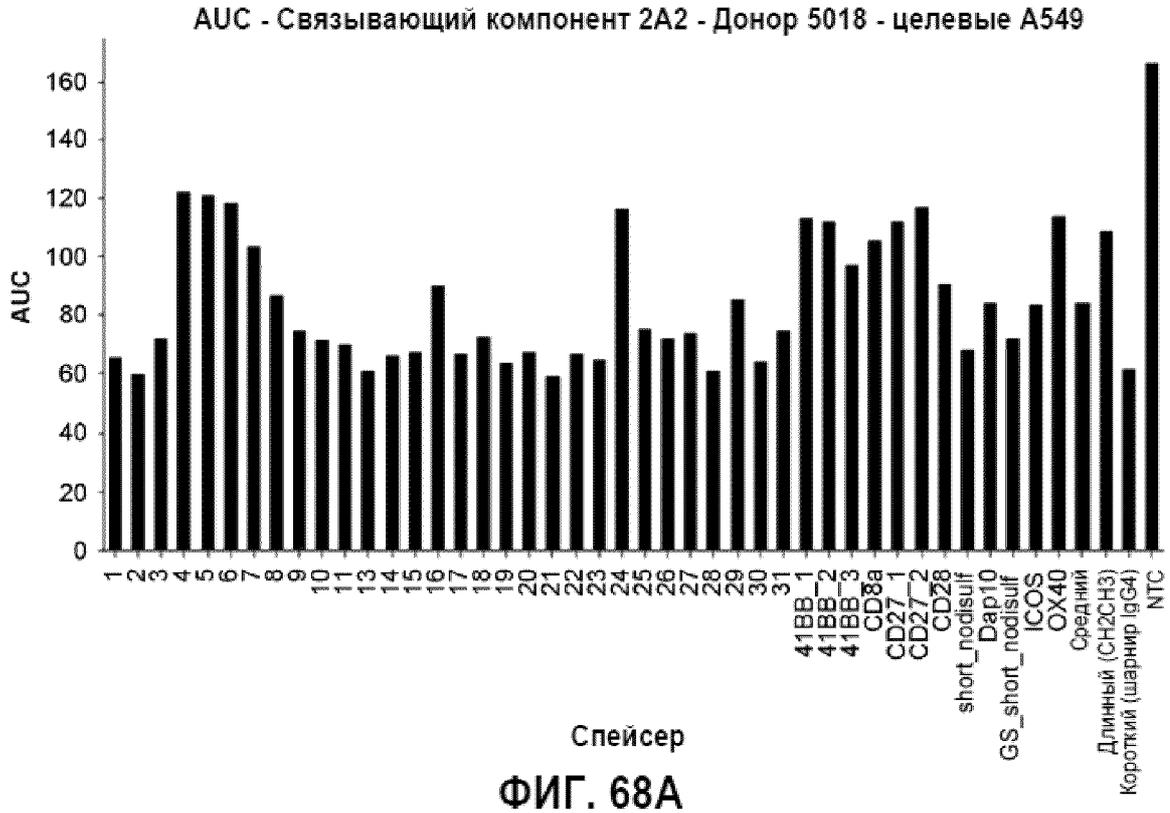


ФИГ. 66D

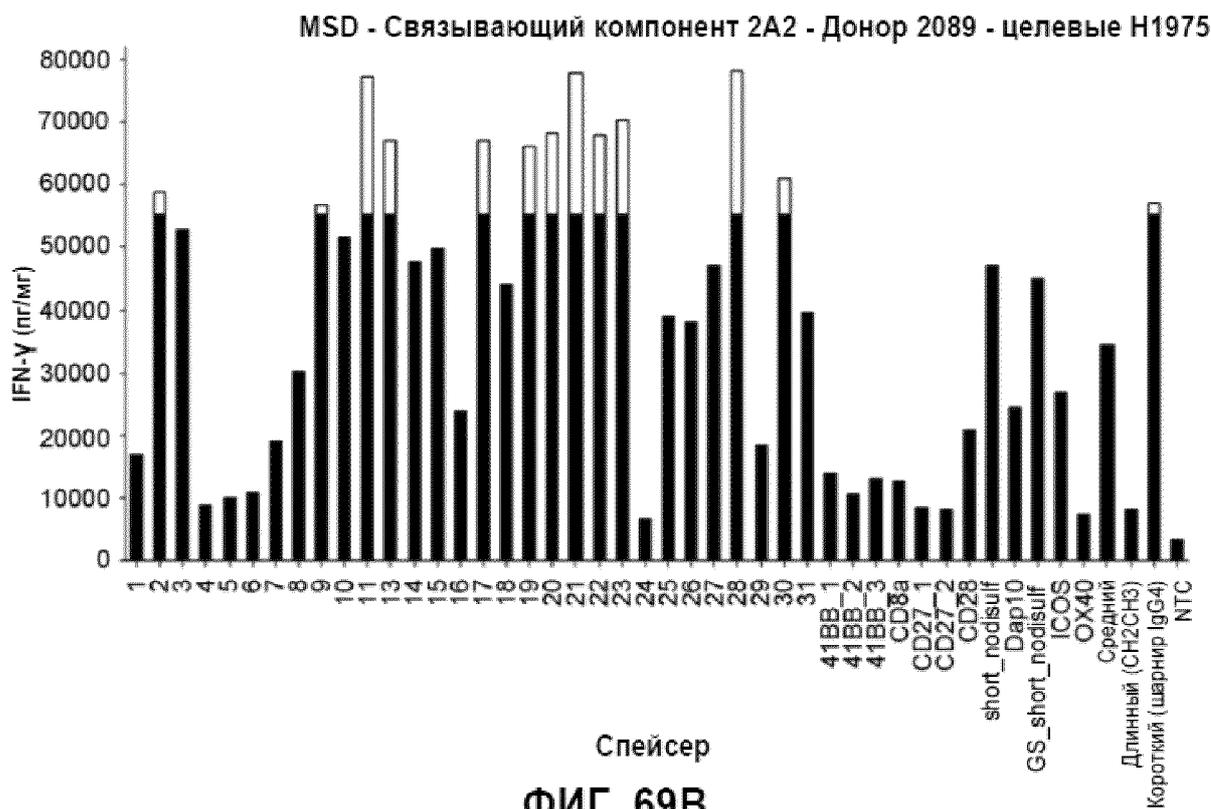
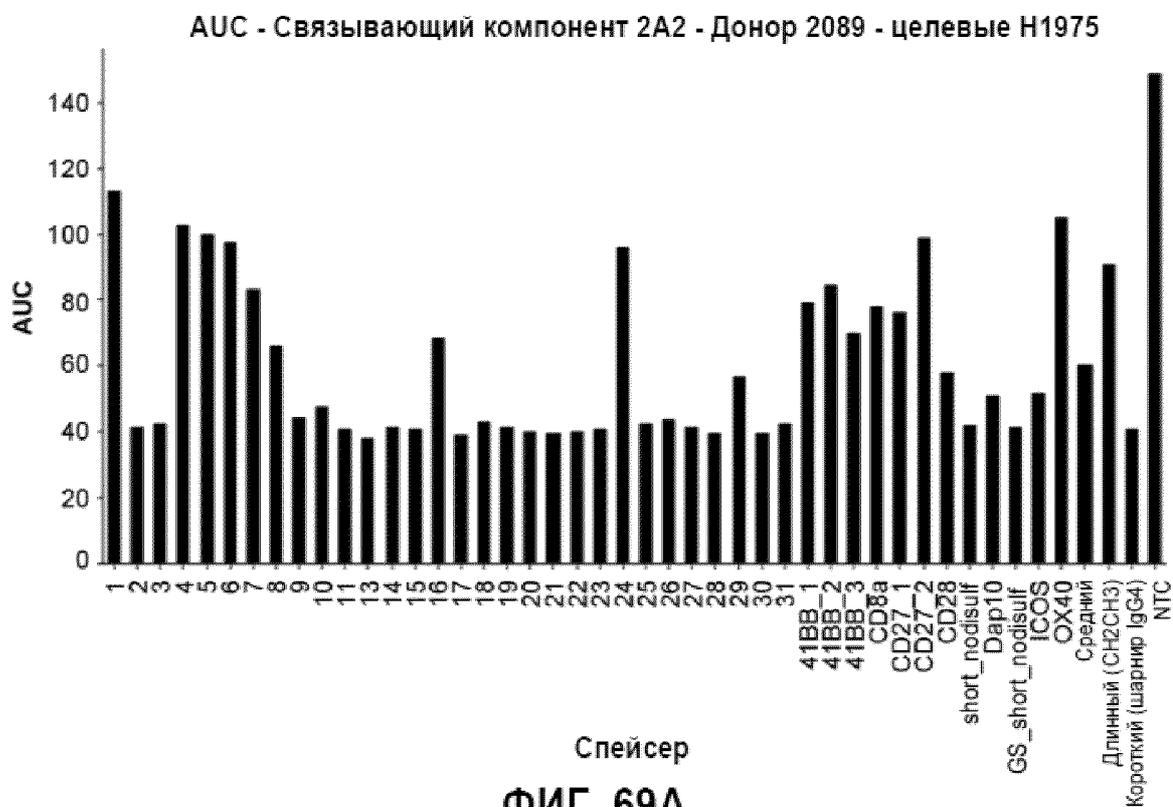
Первичное уничтожение и AUC 2A2-CAR-T D2089: A549-NLR 1:1



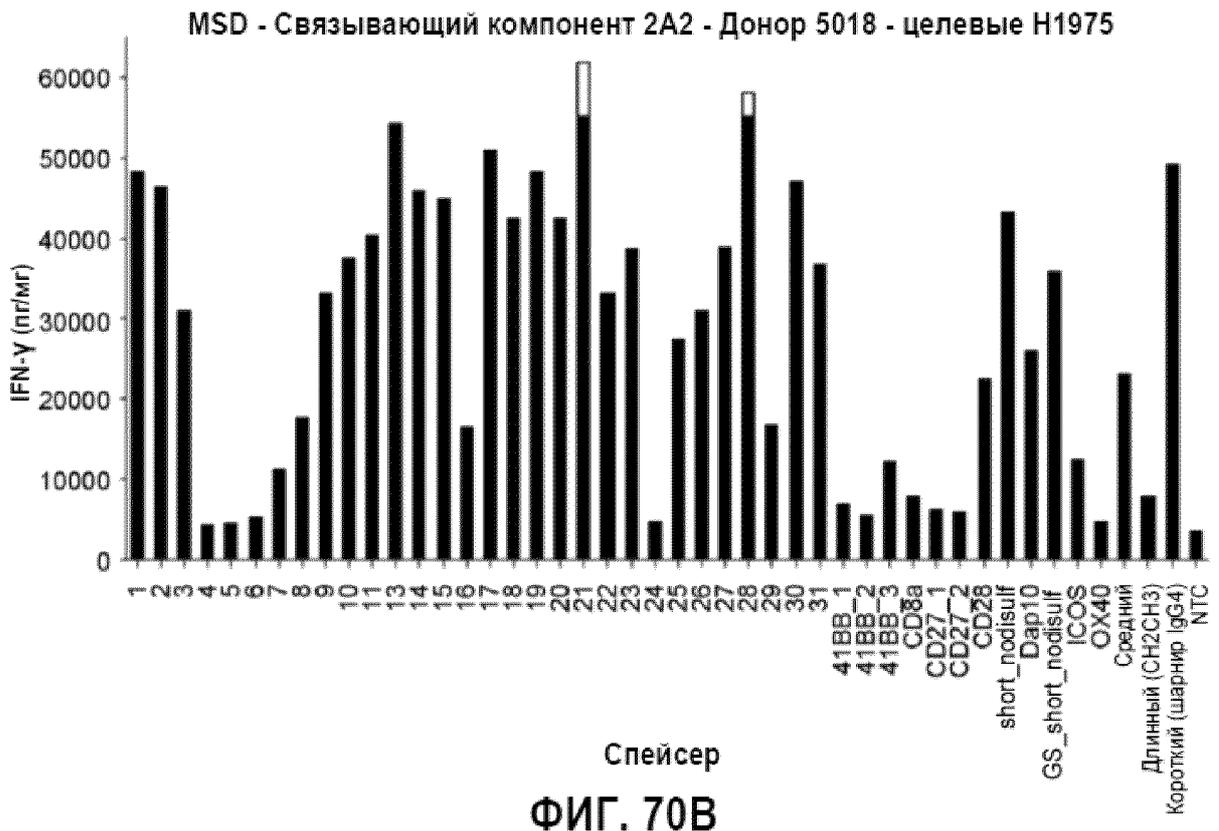
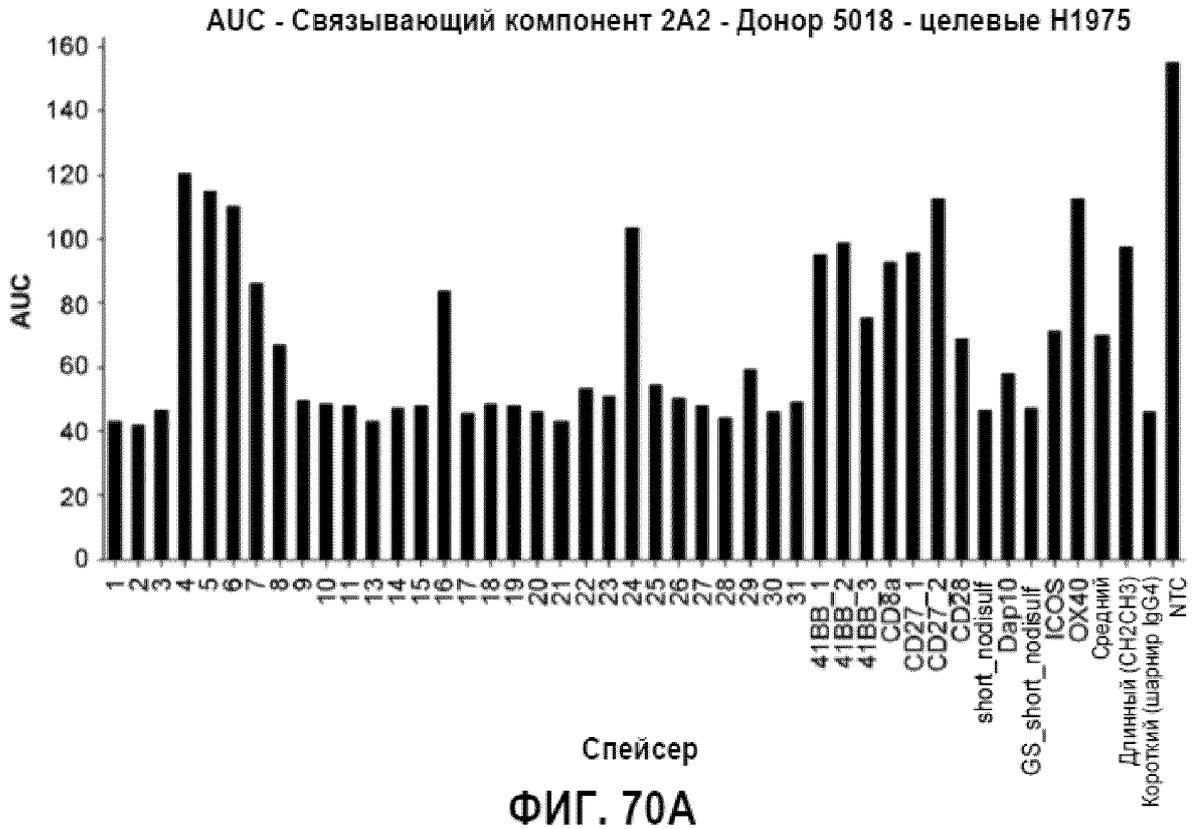
Первичное уничтожение и AUC 2A2-CAR-T D5018: A549-NLR 1:1



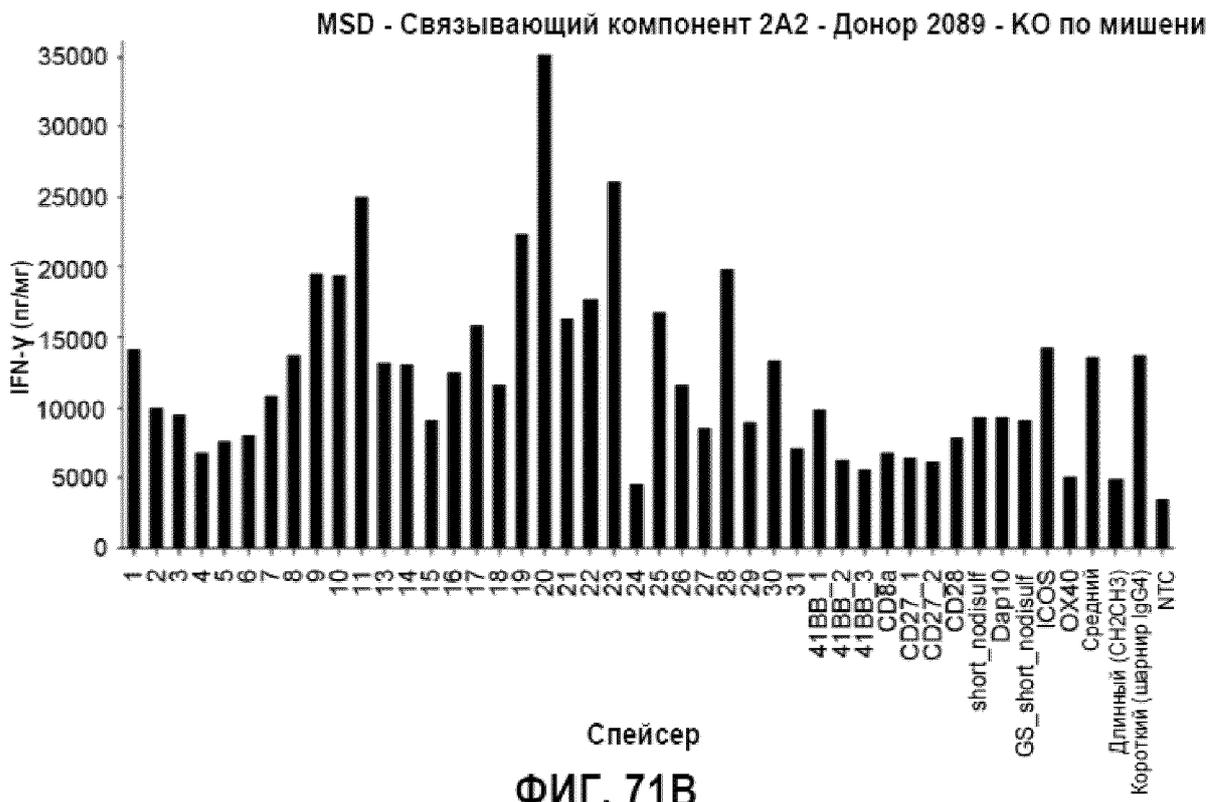
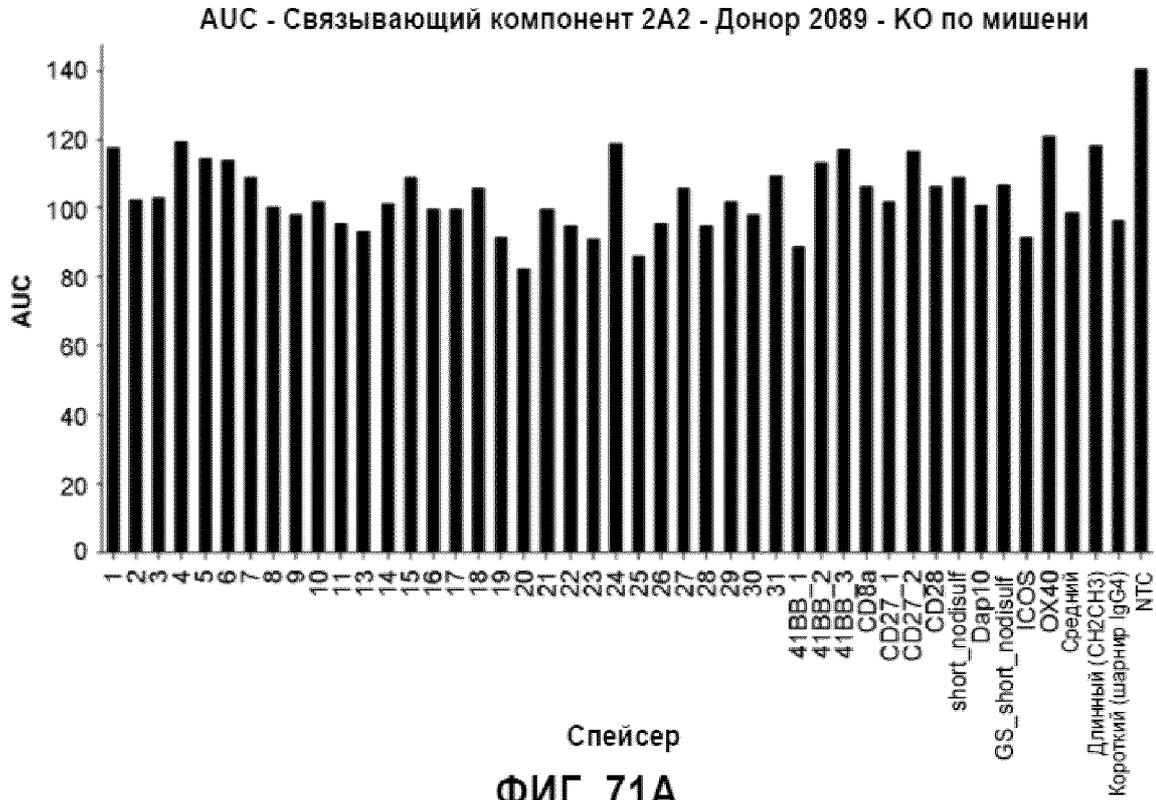
Первичное уничтожение и AUC 2A2-CAR-T D5018: A549-NLR 1:1



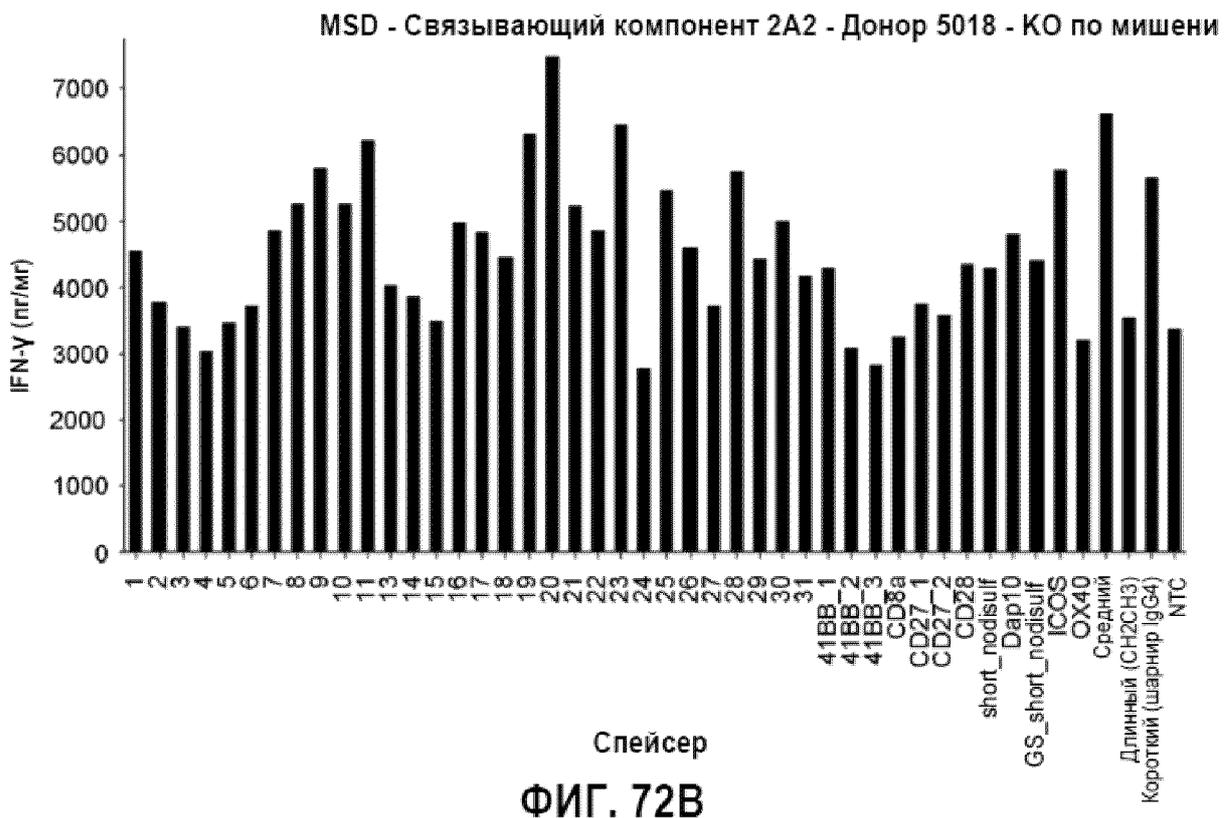
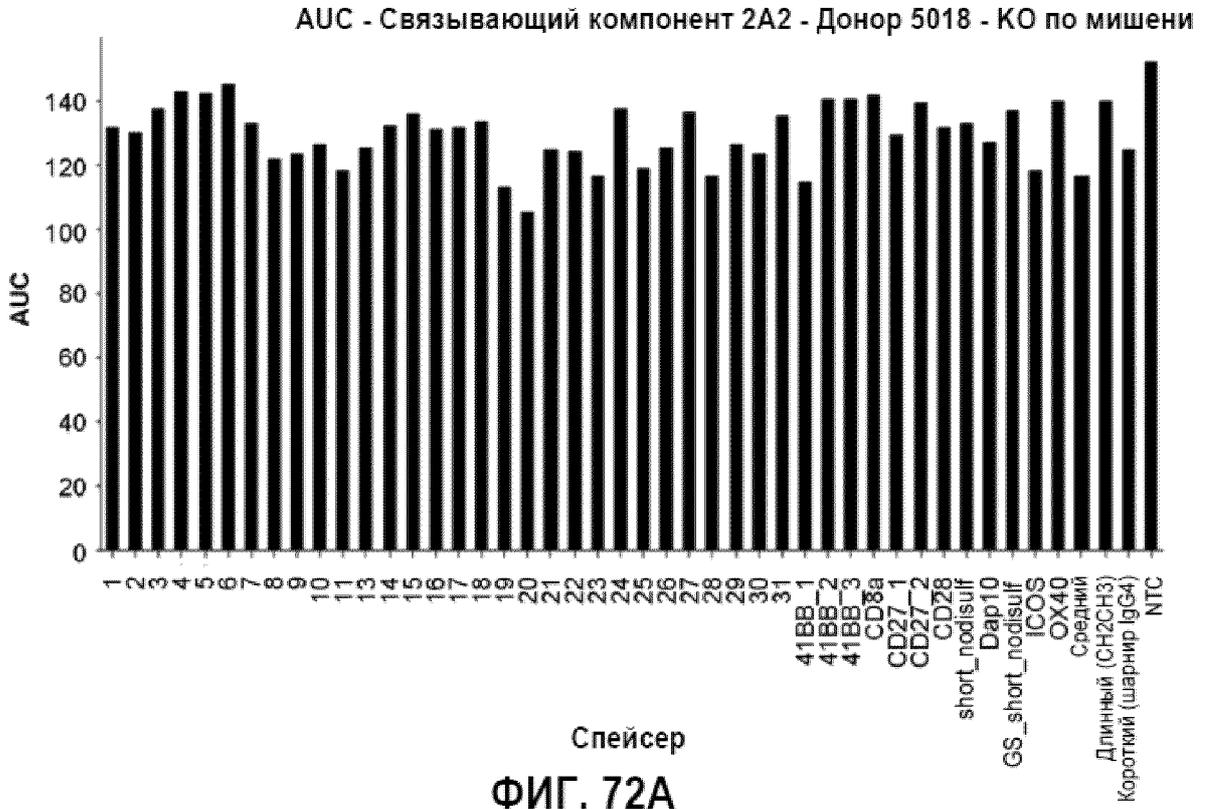
Первичное уничтожение и AUC 2A2-CAR-T D5018: H1975-NLR 1:1



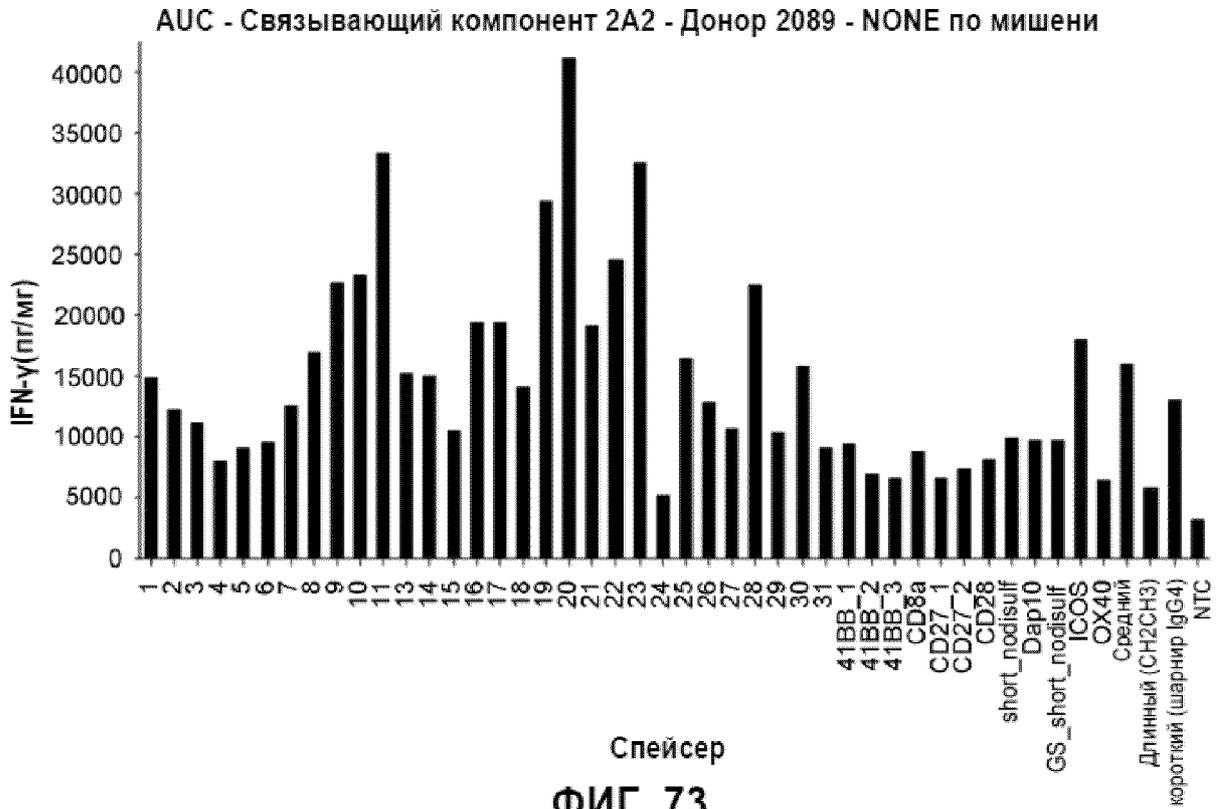
Первичное уничтожение и AUC 2A2-CAR-T D2089: A549-ROR1KO-NLR 1:1



Первичное уничтожение и AUC 2A2-CAR-T D5018: A549-ROR1KO-NLR 1:1

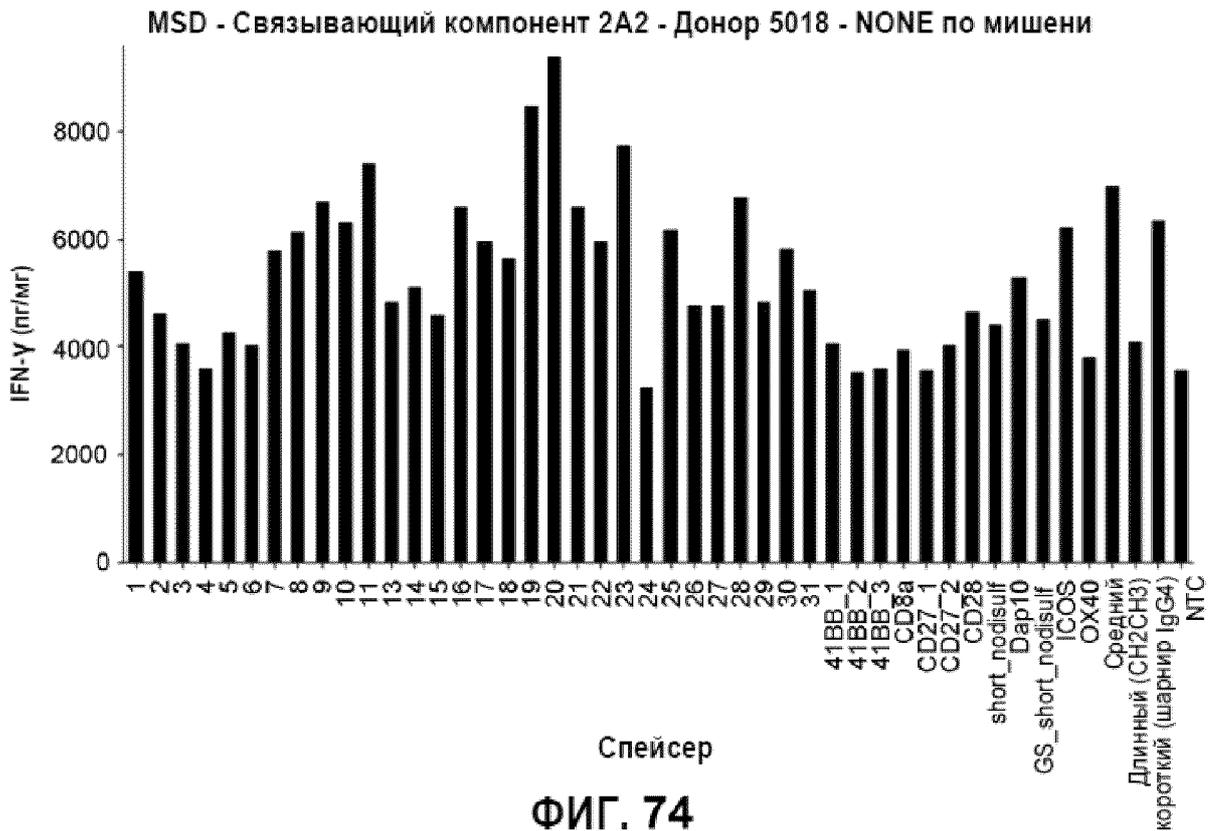


Независимые от мишени цитокины для 2A2-CAR-T D2089



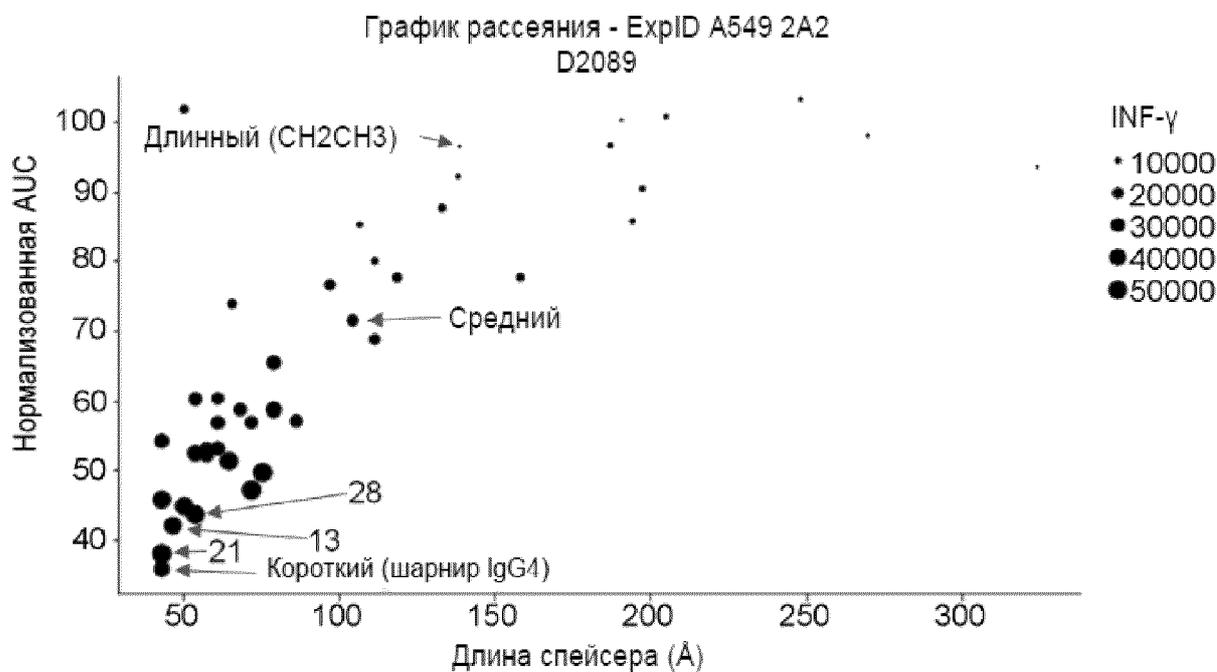
ФИГ. 73

Независимые от мишени цитокины для 2A2-CAR-T D5018

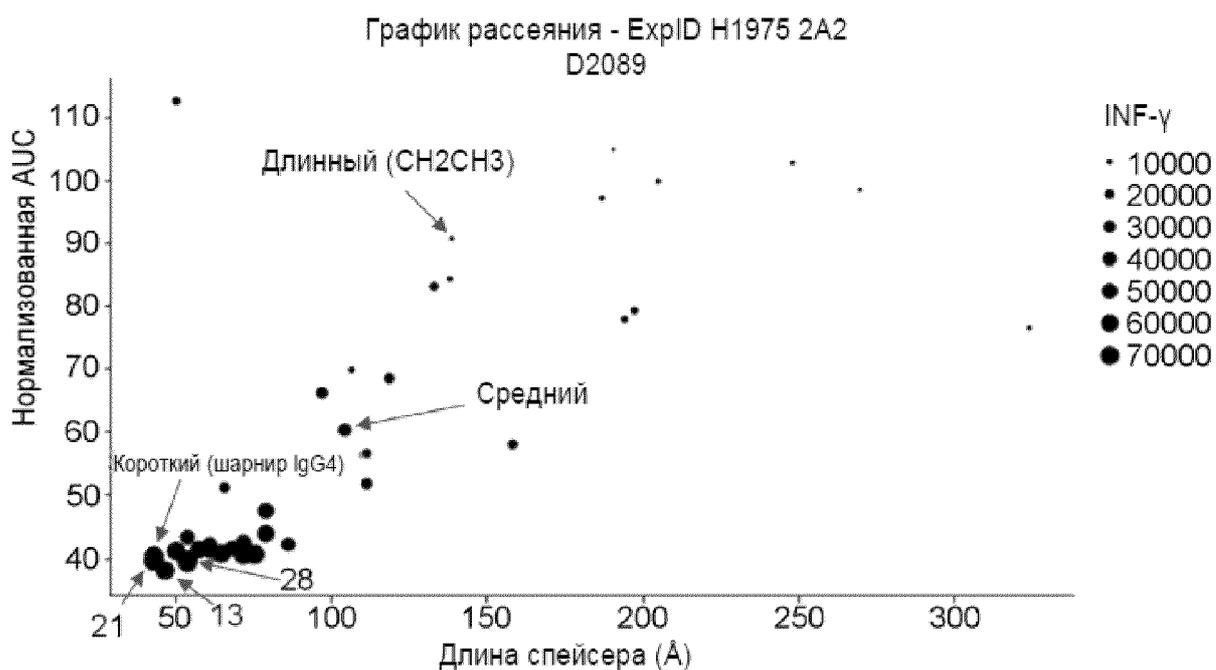


ФИГ. 74

2A2-CAR-T D2089 Графики рассеяния указывают на оптимальную длину спейсера для 2A2, равную $\sim 45\text{\AA}$

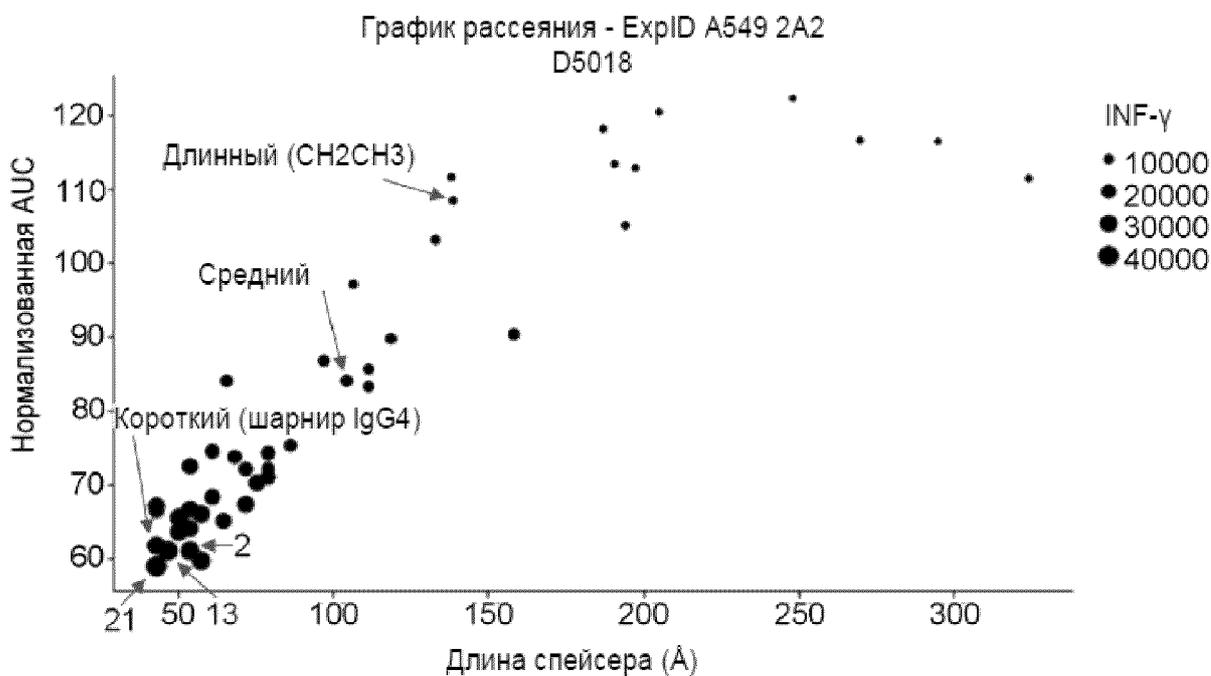


ФИГ. 75А

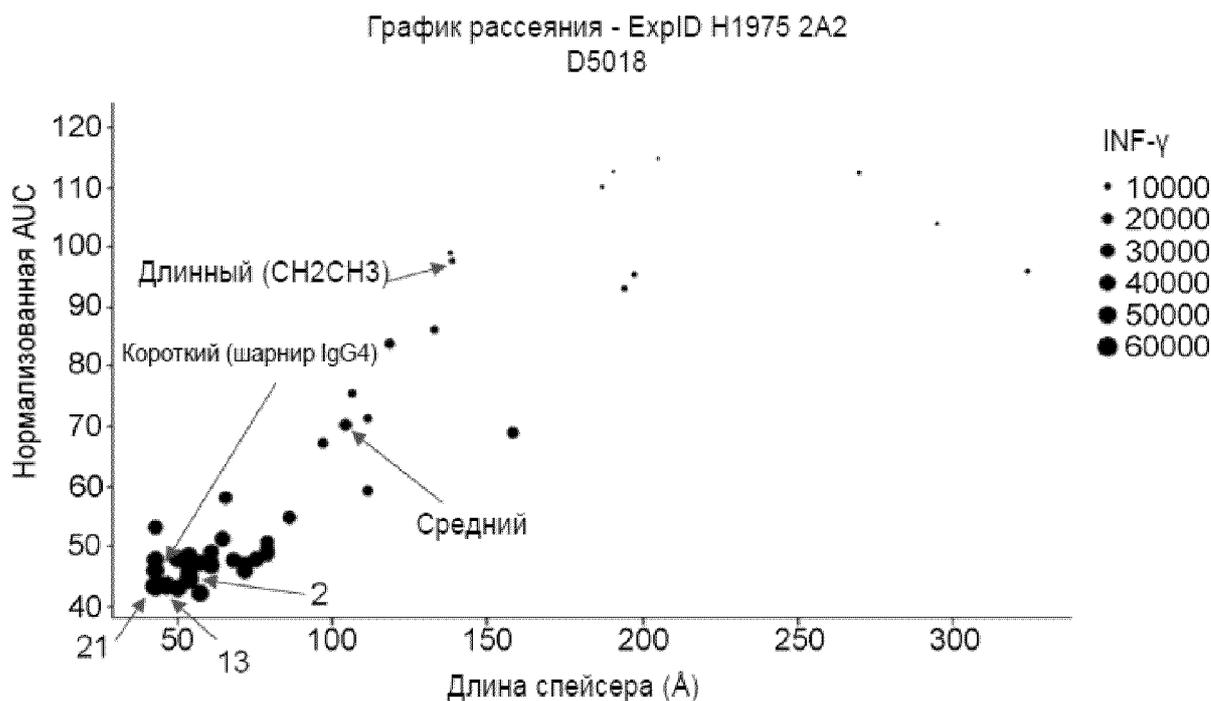


ФИГ. 75В

2A2-CAR-T D5018 Графики рассеяния указывают на оптимальную длину спейсера для 2A2, равную $\sim 45\text{\AA}$



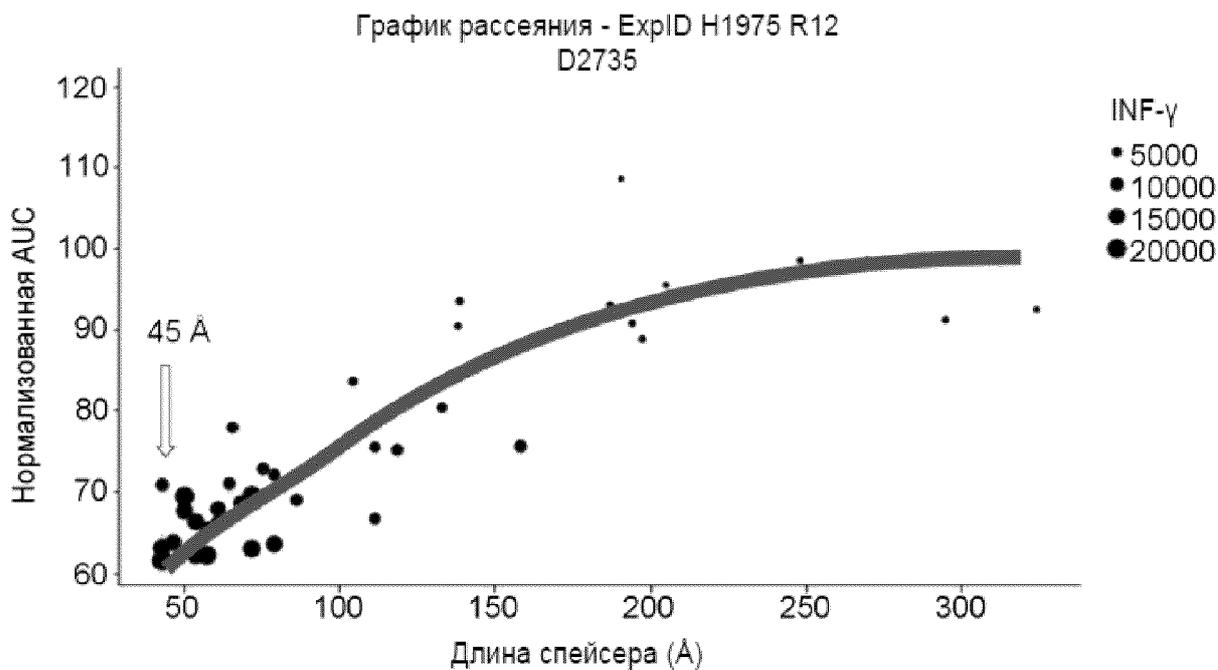
ФИГ. 76А



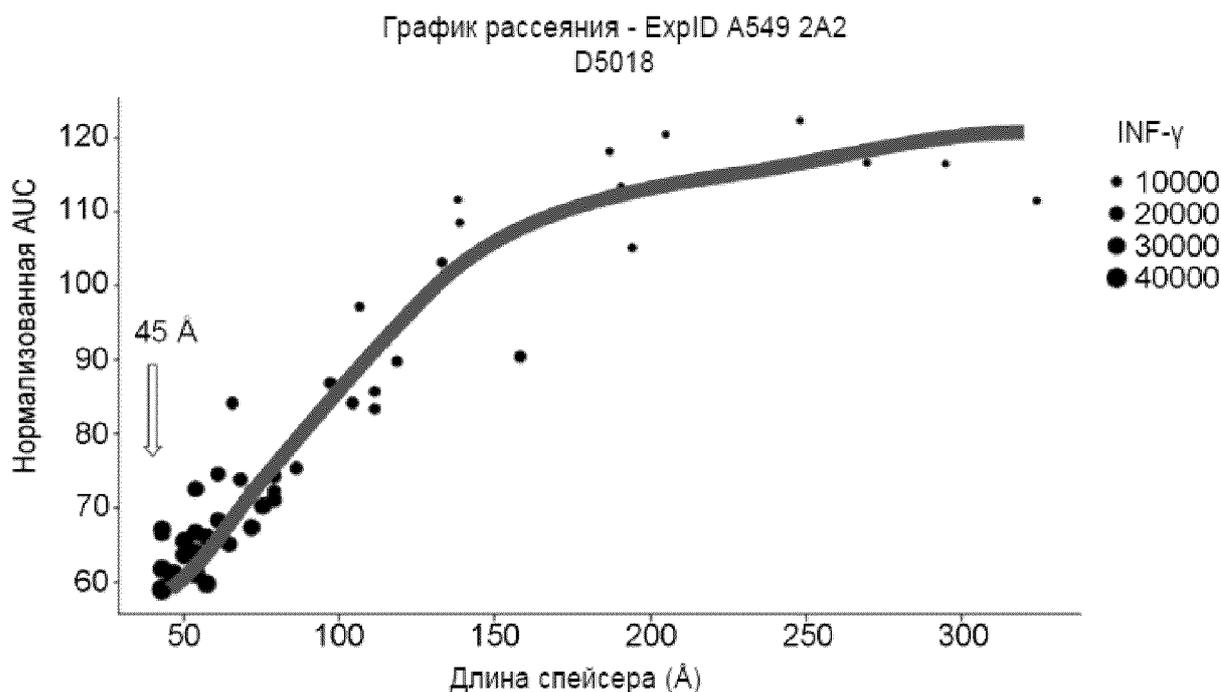
ФИГ. 76В

127/149

Иллюстративная пузырьковая диаграмма по донору/связывающему компоненту/мишени демонстрирует оптимальную длину спейсера для конкретного связующего.



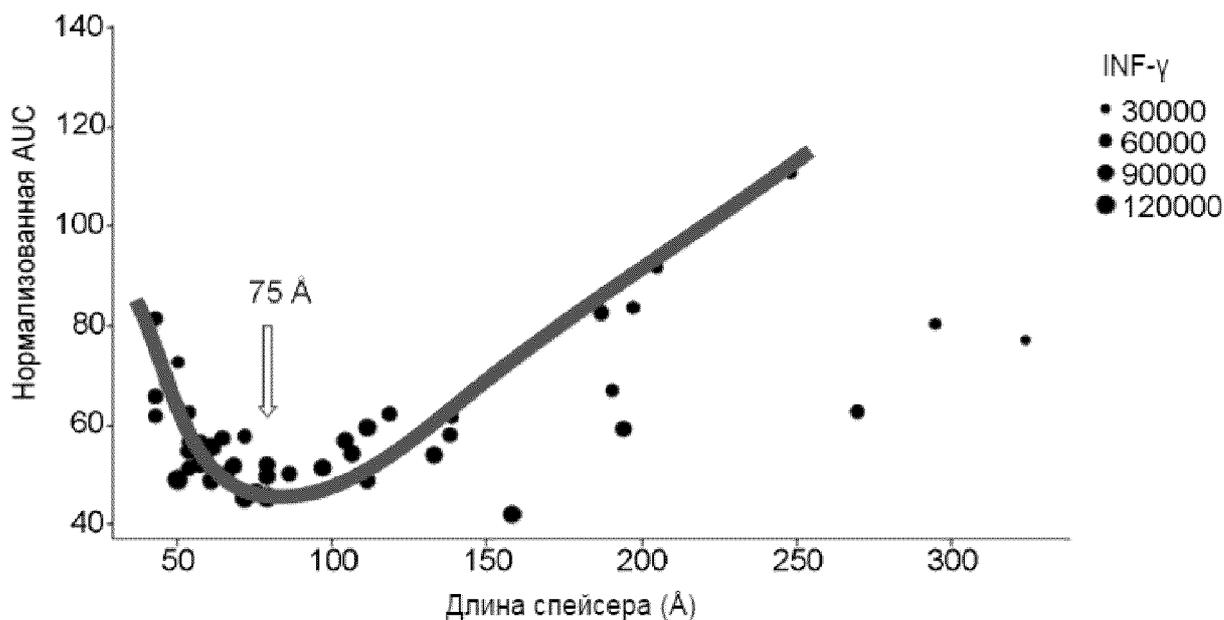
ФИГ. 77А



ФИГ. 77В

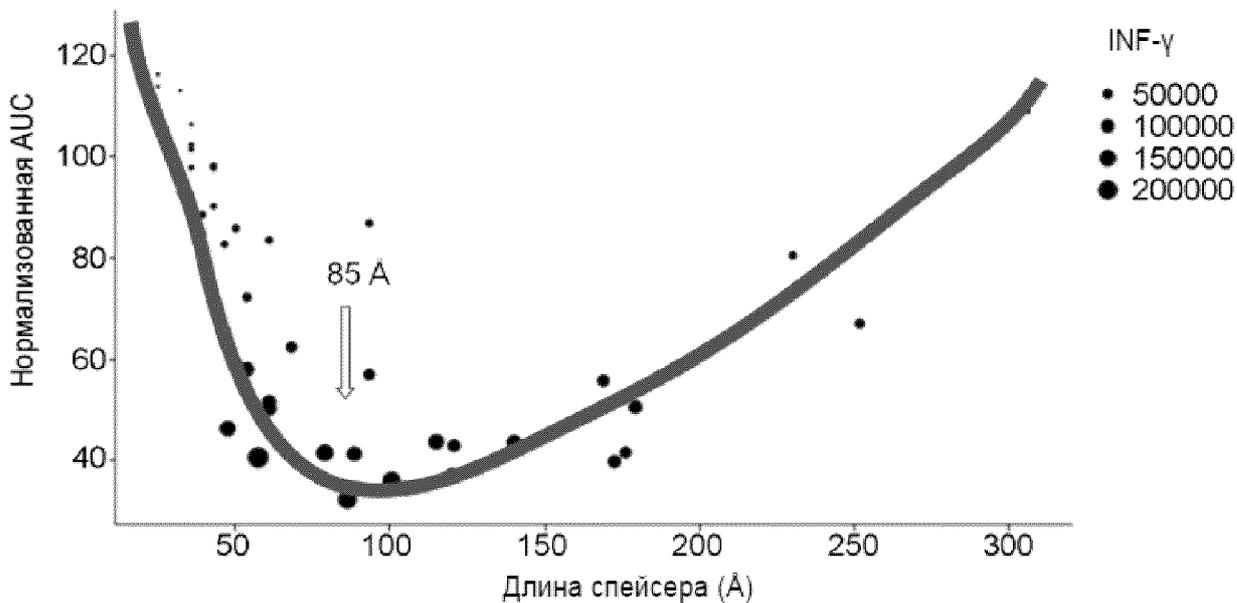
Иллюстративная пузырьковая диаграмма по донору/связывающему компоненту/мишени демонстрирует оптимальную длину спейсера для конкретного связующего.

График рассеяния - ExpID Raji FMC63
D4869



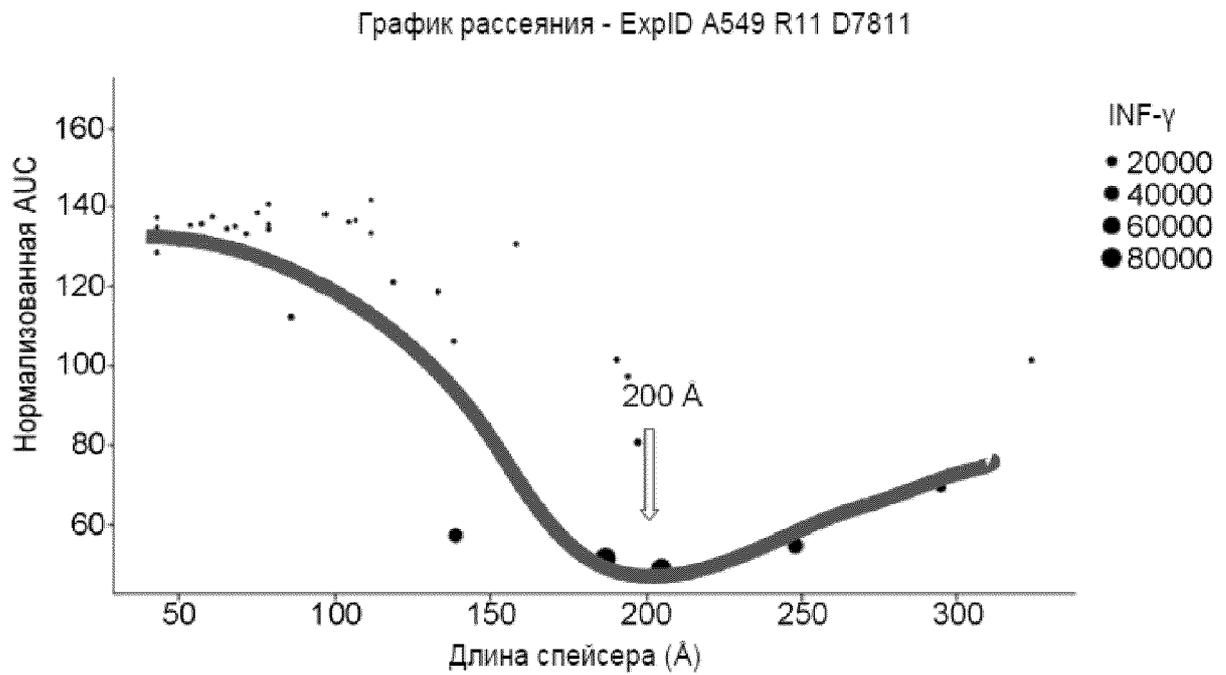
ФИГ. 77С

График рассеяния - ExpID T47D анти-Her2
D13814



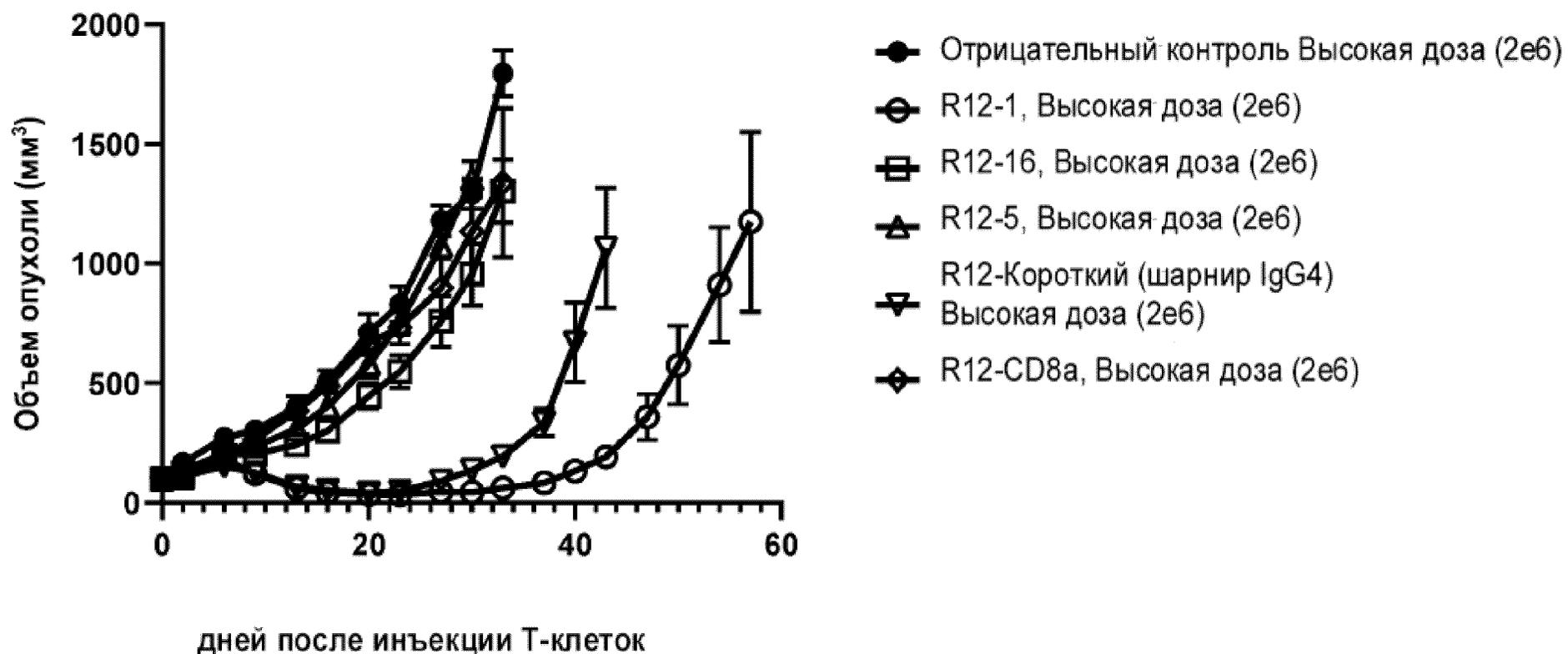
ФИГ. 77D

Иллюстративная пузырьковая диаграмма по донору/связывающему компоненту/мишени демонстрирует оптимальную длину спейсера для конкретного связующего.



ФИГ. 77E

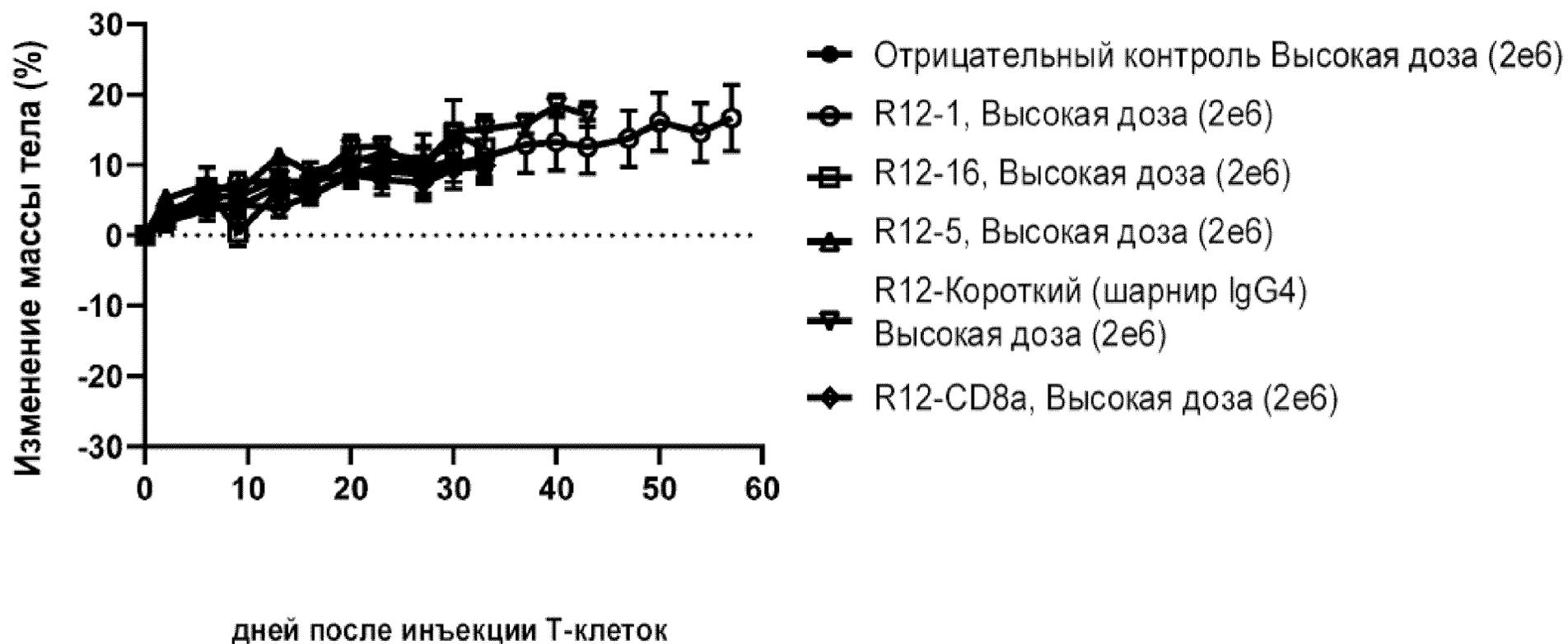
L0123 H1975 Донор 3035586
Средний объем опухоли Высокая доза



130/149

ФИГ. 78А

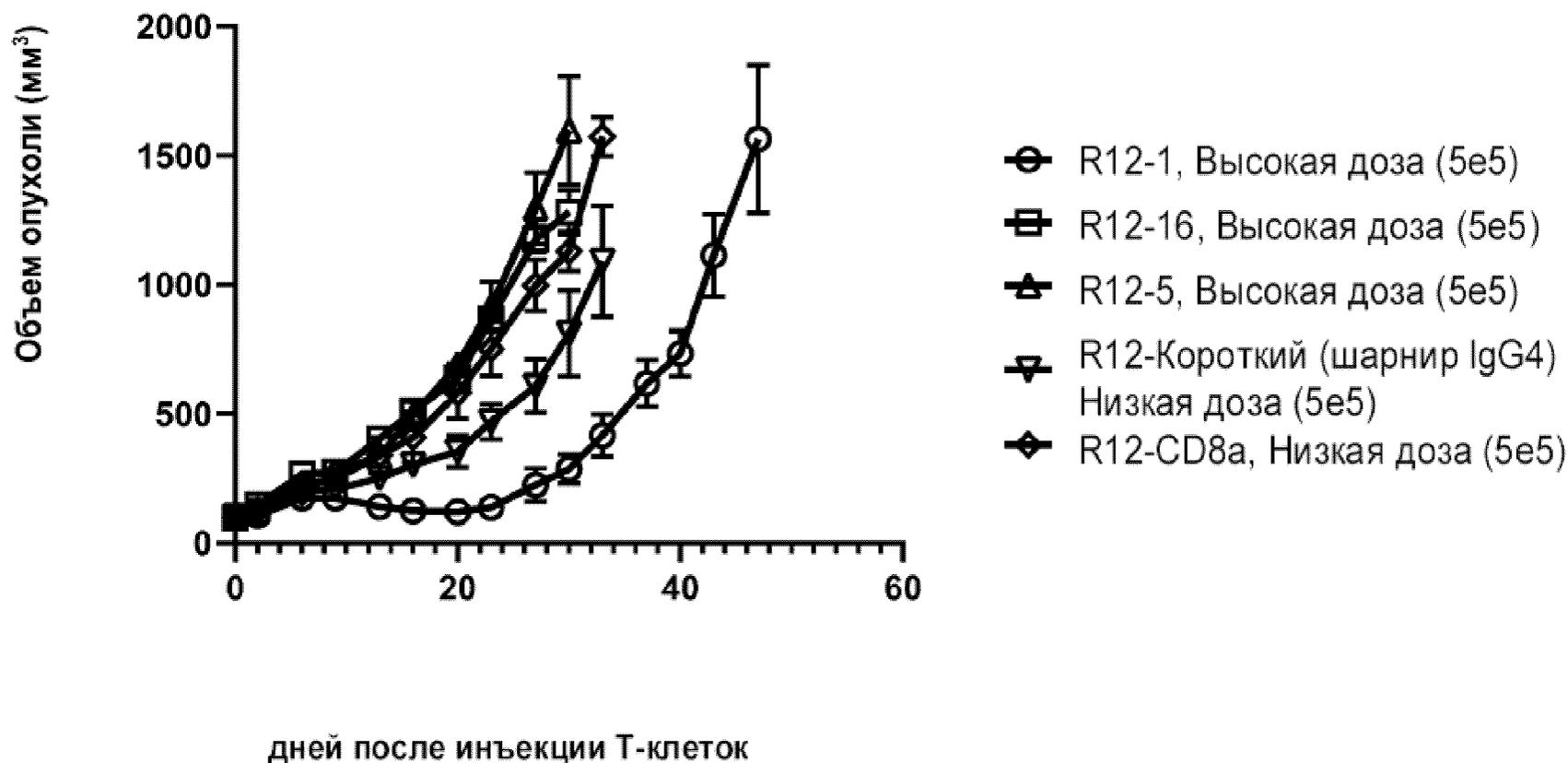
L0123 H1975 Донор 3035586
Масса тела, Высокая доза



131/149

ФИГ. 78В

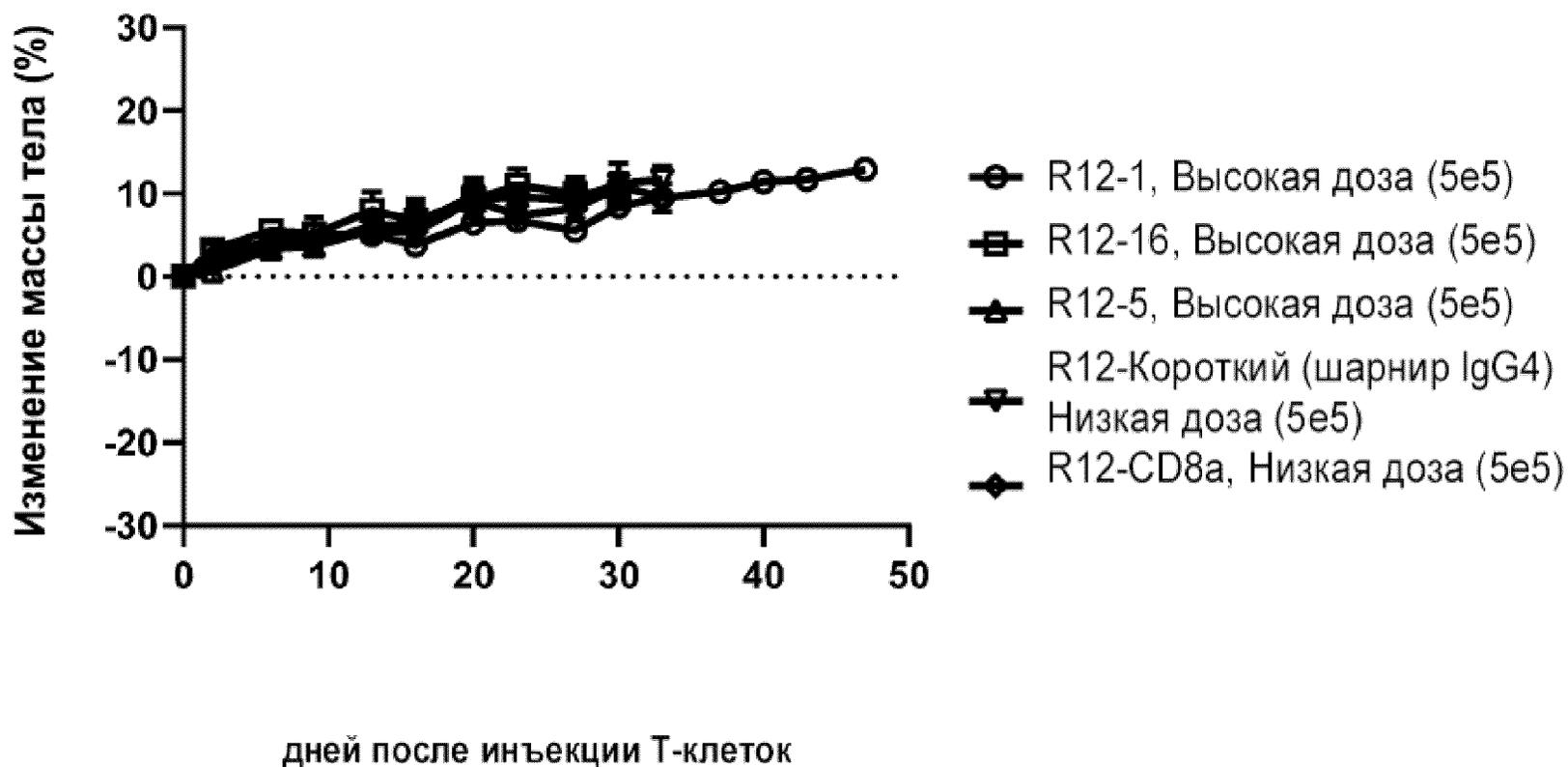
L0123 H1975 Донор 3035586
Средний объем опухоли
Низкая доза



132/149

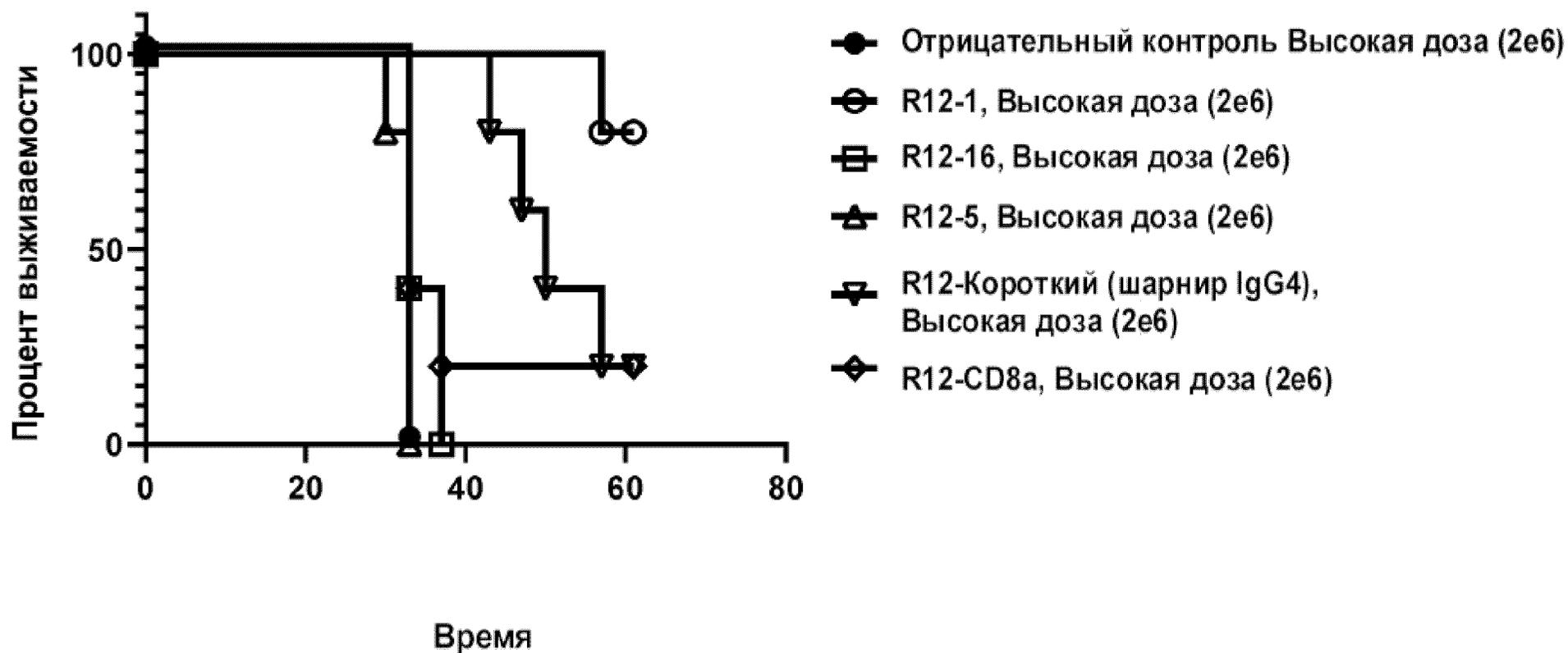
ФИГ. 79А

L0123 H1975 Донор 3035586
Масса тела, Высокая доза



ФИГ. 79В

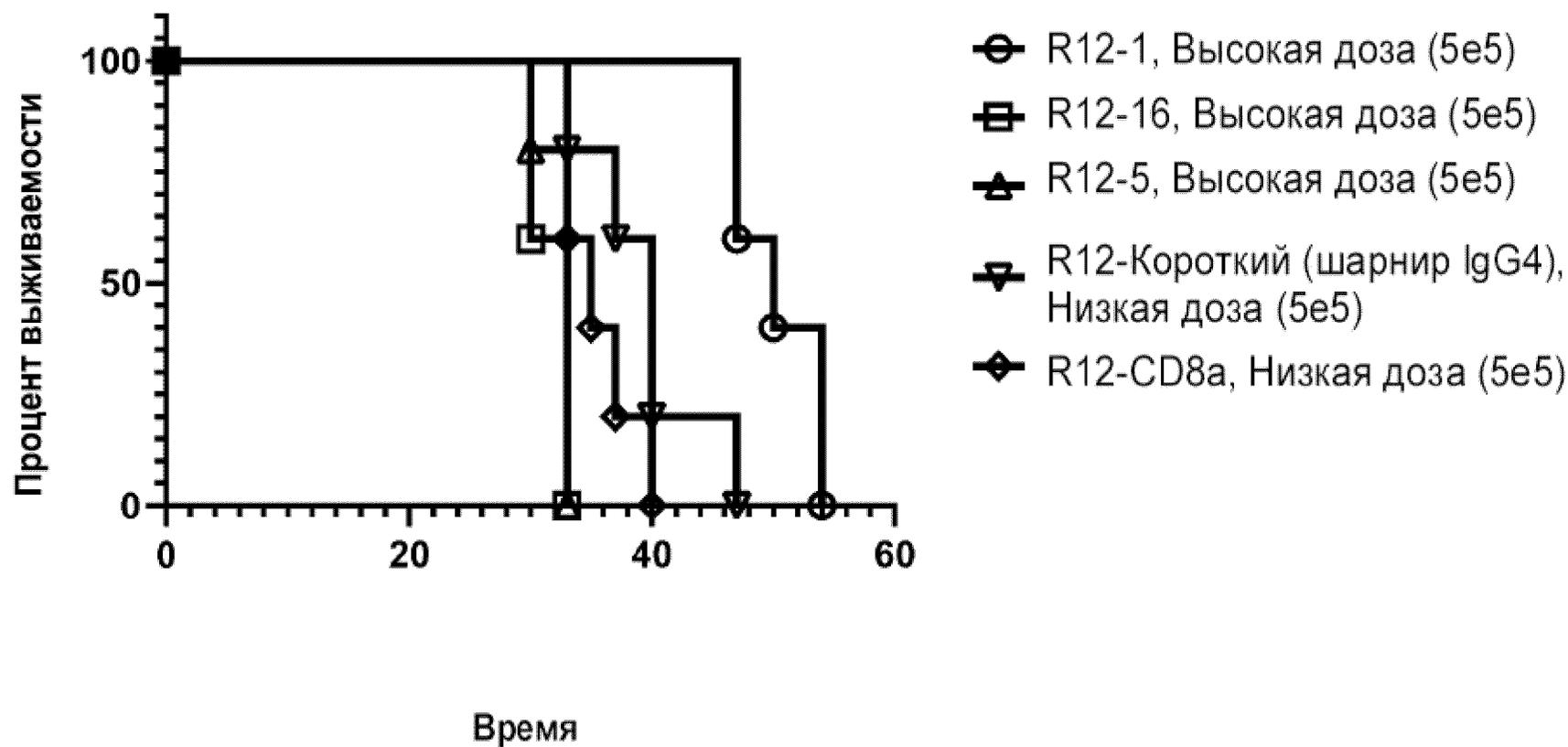
L0123 H1975 Донор 3035586
Выживаемость, Высокая доза



134/149

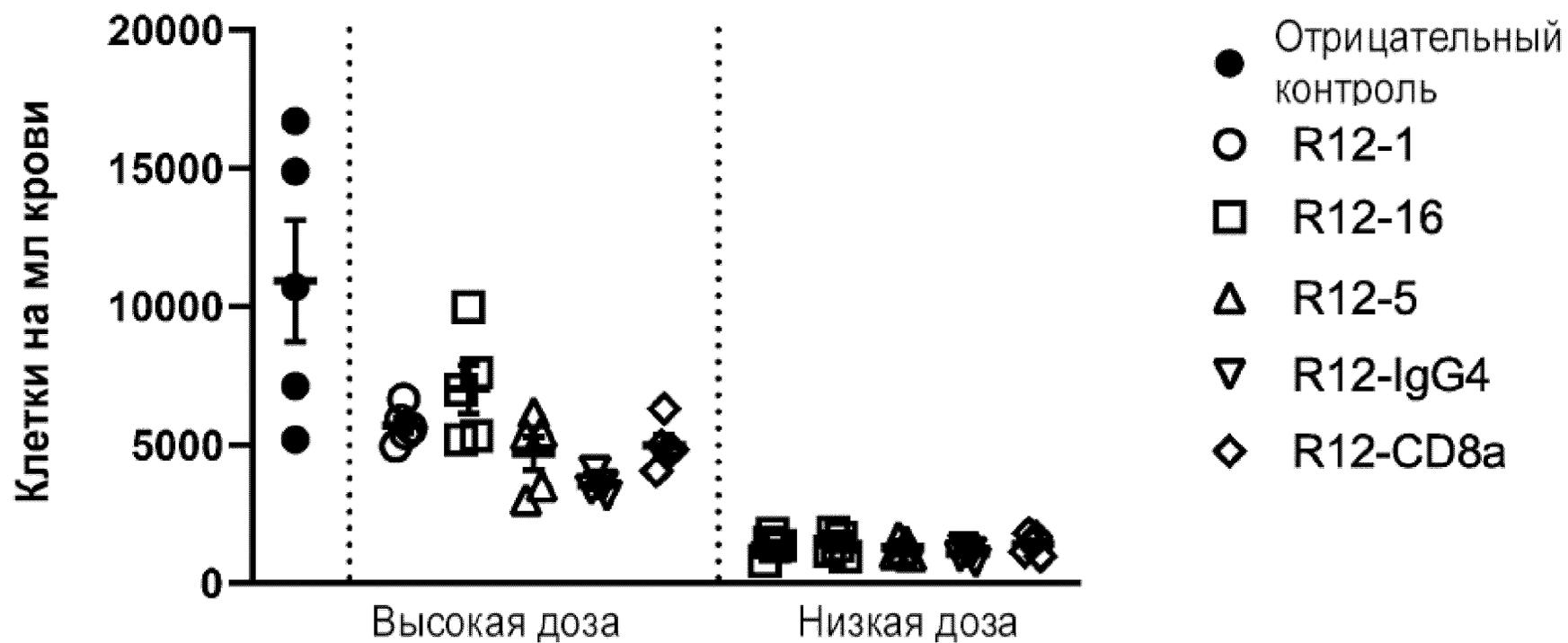
ФИГ. 80

L0123 H1975 Донор 3035586
Выживаемость, Низкая доза



ФИГ. 81

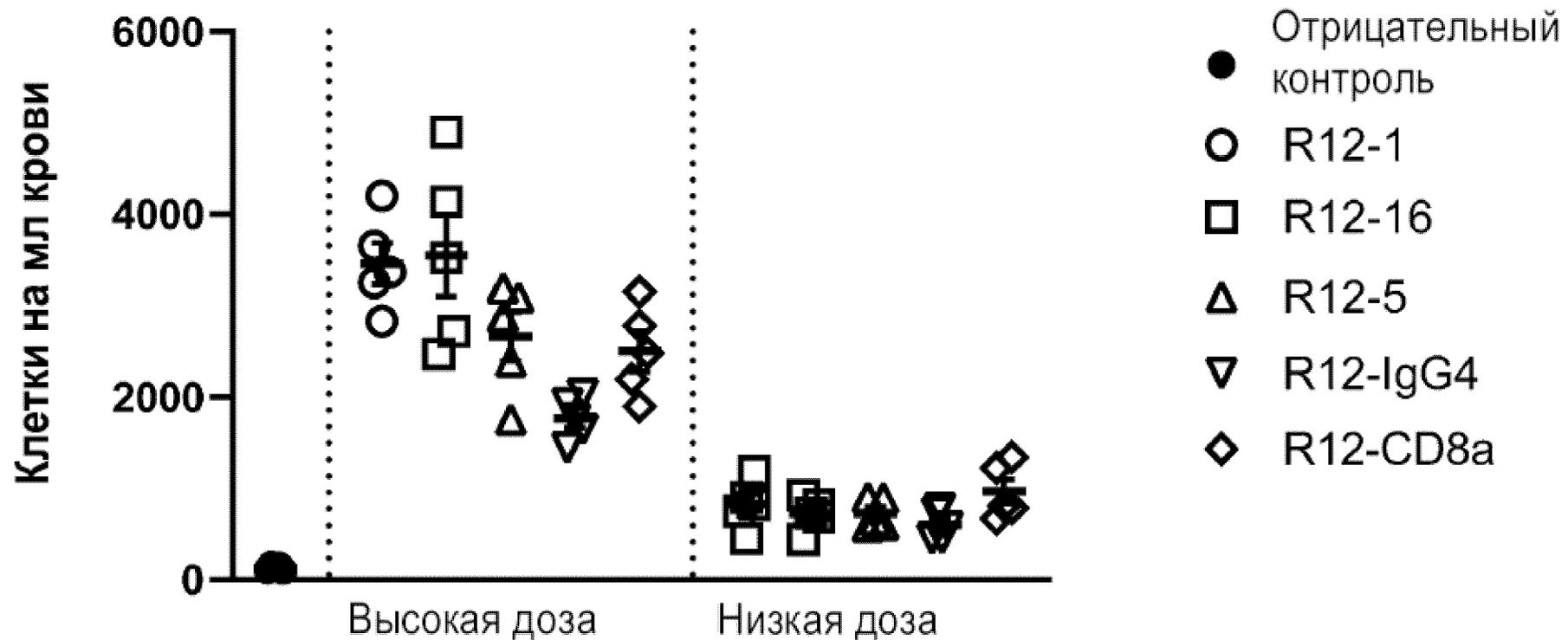
L0123 H1975 D3035586 ФК CD3+ в крови на 1 день



136/149

ФИГ. 82

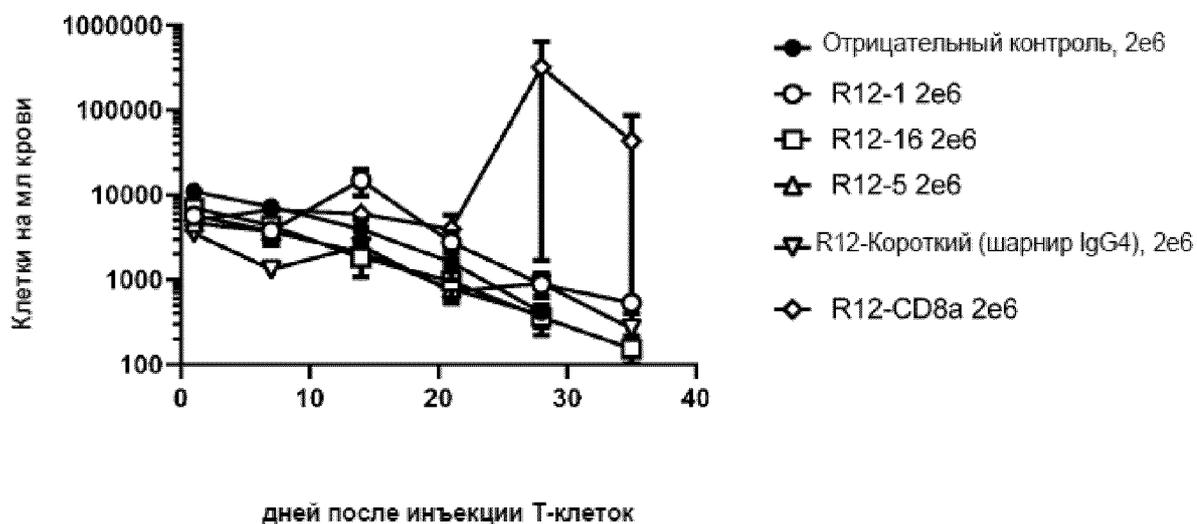
L0123 H1975 D3035586 ФК CD3+ EGFR+ в крови на 1 день



137/149

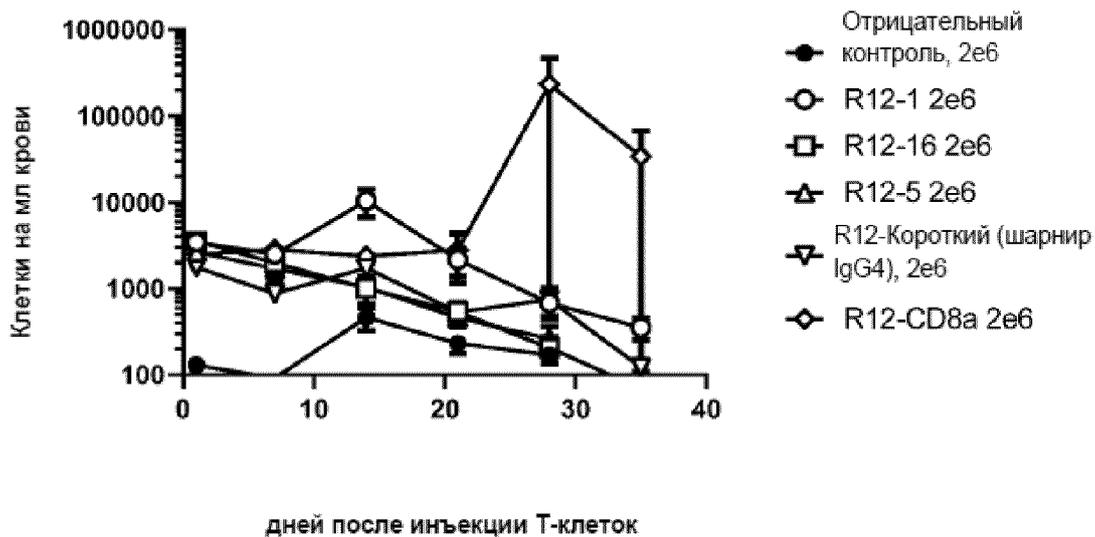
ФИГ. 83

L0123 H1975 D3035586 ФК CD3+ в крови, Высокая доза



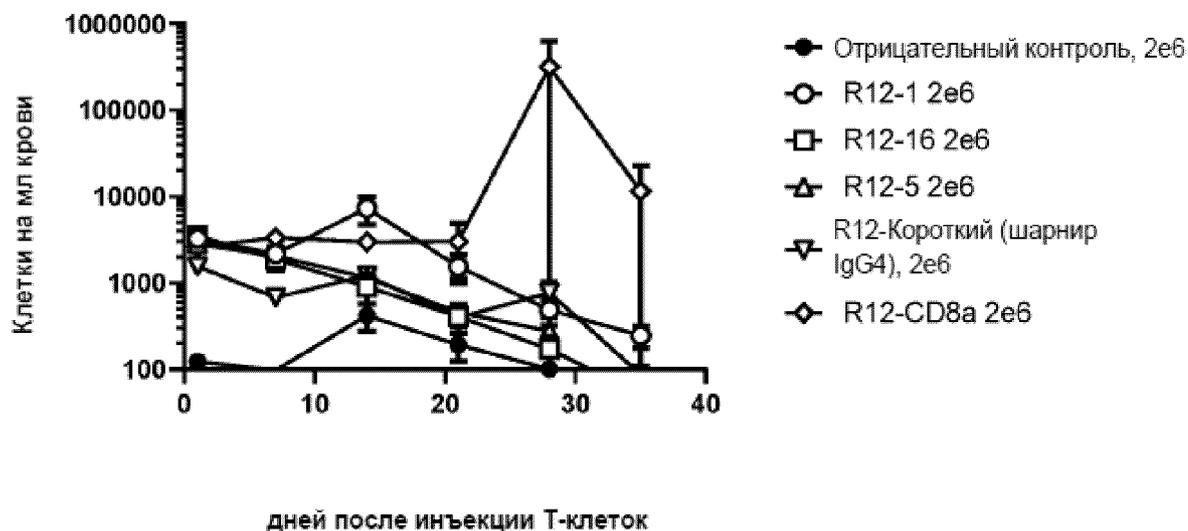
ФИГ. 84А

L0123 H1975 D3035586 ФК CD3+ EGFR+ в крови, Высокая доза



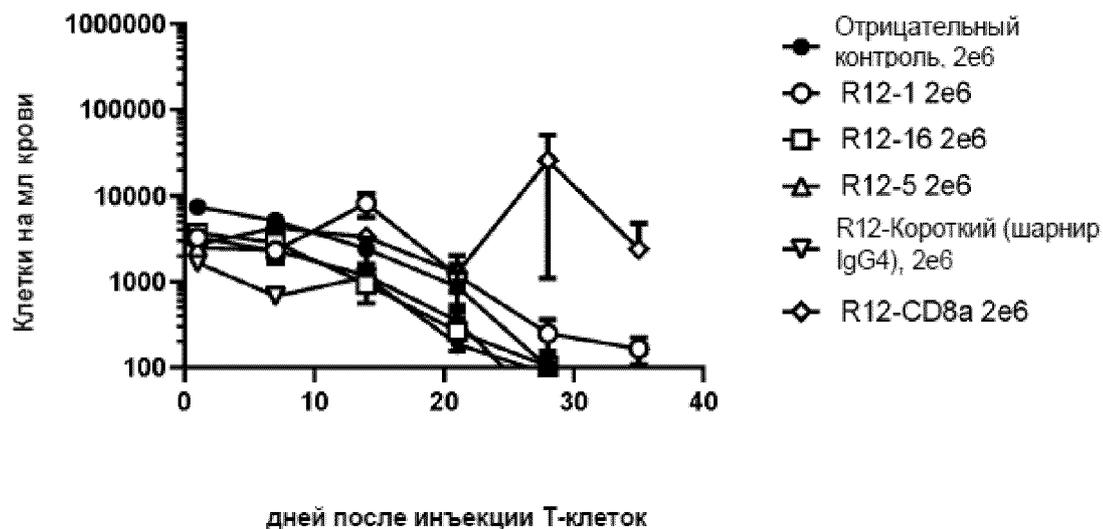
ФИГ. 84В

L0123 H1975 D3035586 ФК CD3+ CAR+ в крови, Высокая доза



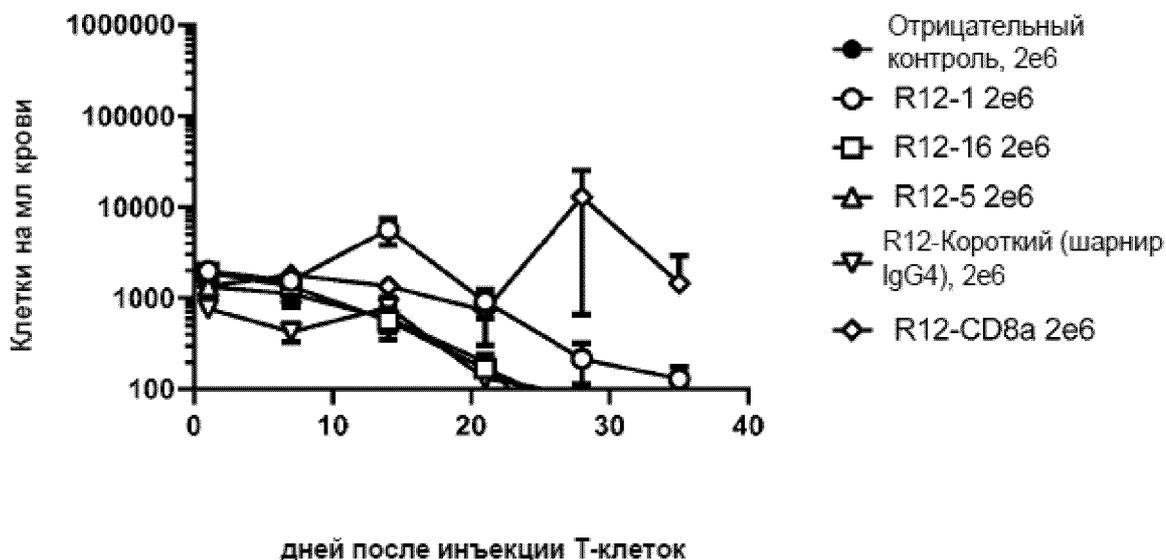
ФИГ. 84С

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+ в крови, Высокая доза



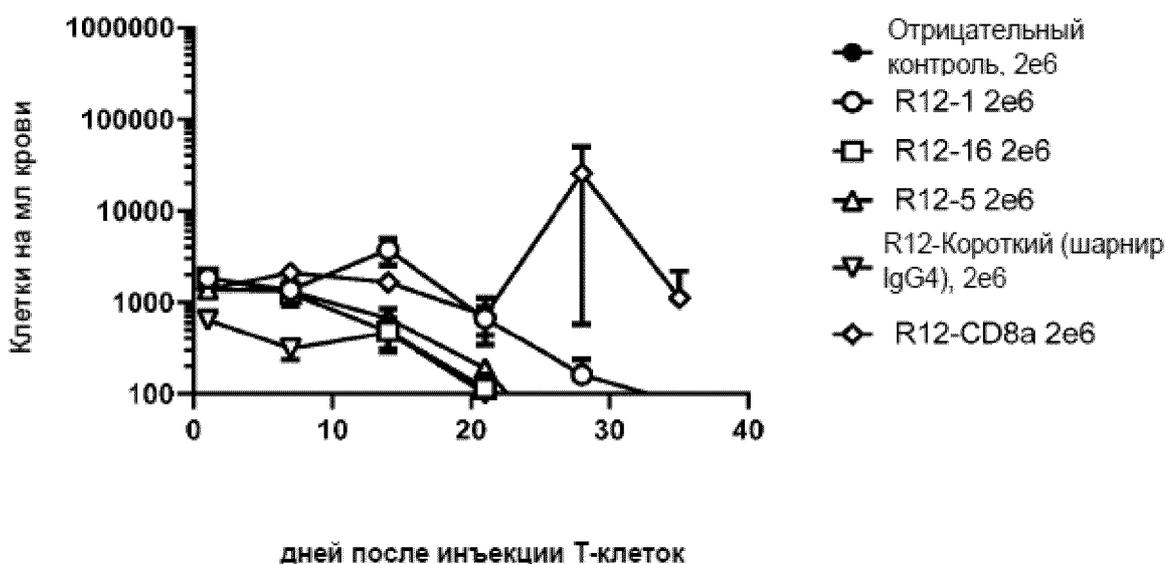
ФИГ. 84D

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+ EGFR+ в крови, Высокая доза



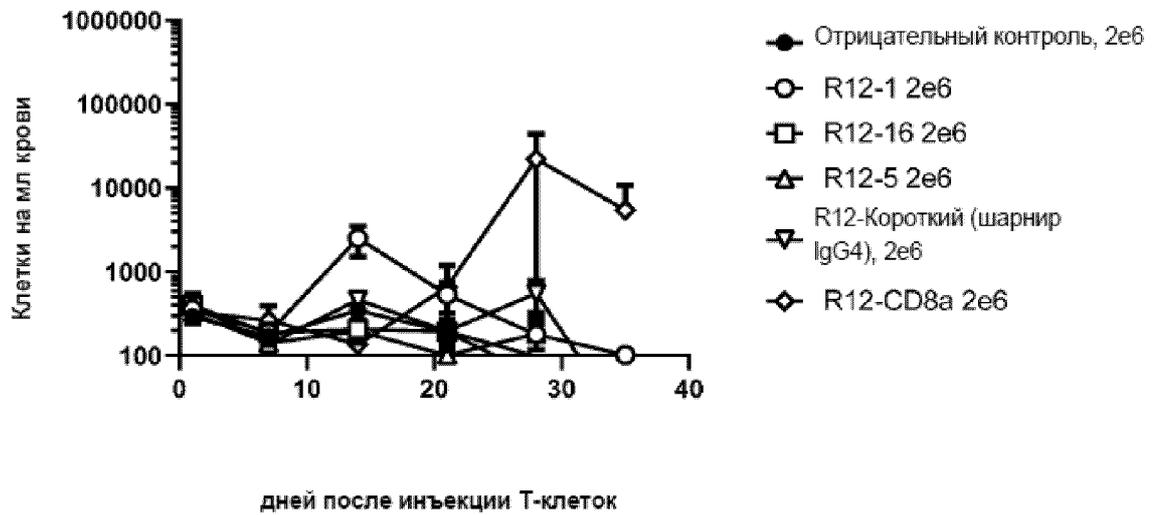
ФИГ. 84E

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+ CAR+ в крови, Высокая доза



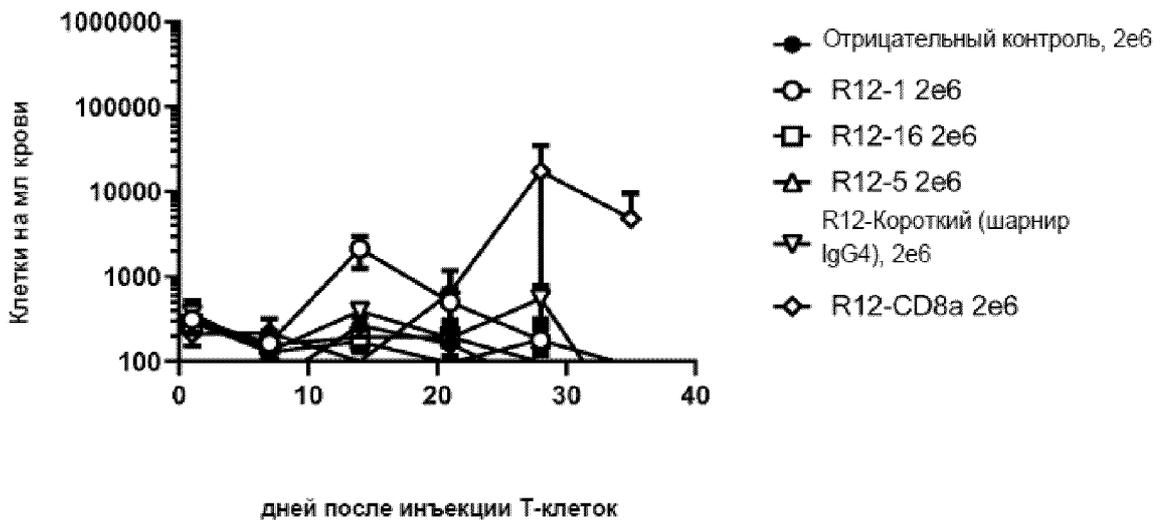
ФИГ. 84F

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+CD4+ в крови, Высокая доза



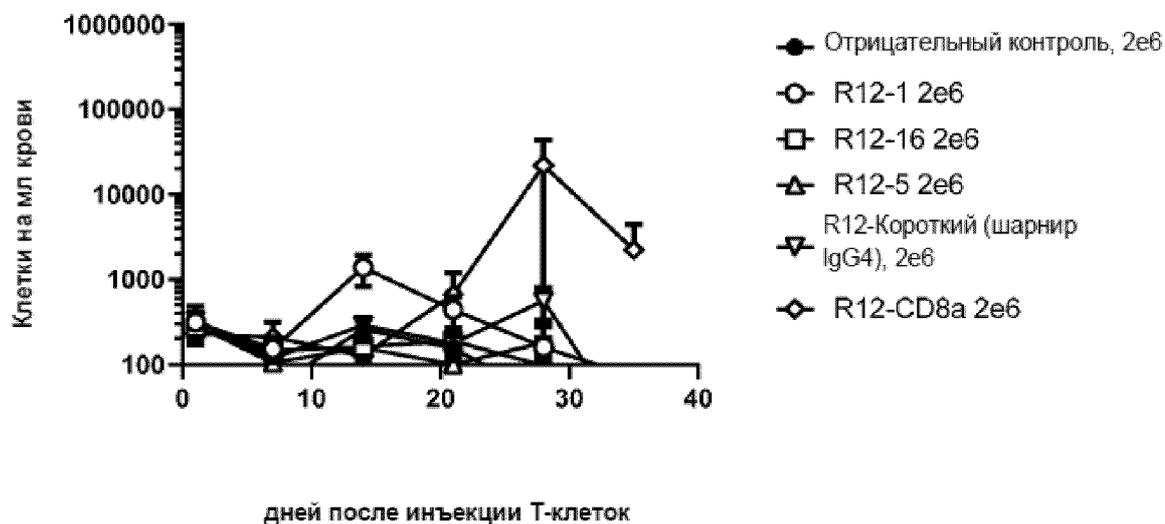
ФИГ. 84G

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+CD4+ EGFR+ в крови, Высокая доза



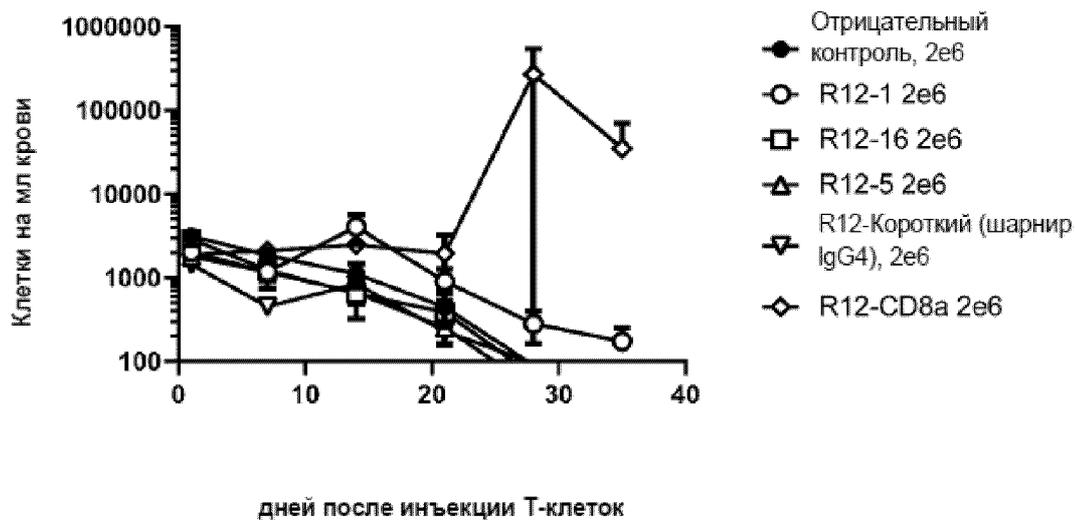
ФИГ. 84H

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+CD4+ CAR+ в крови, Высокая доза



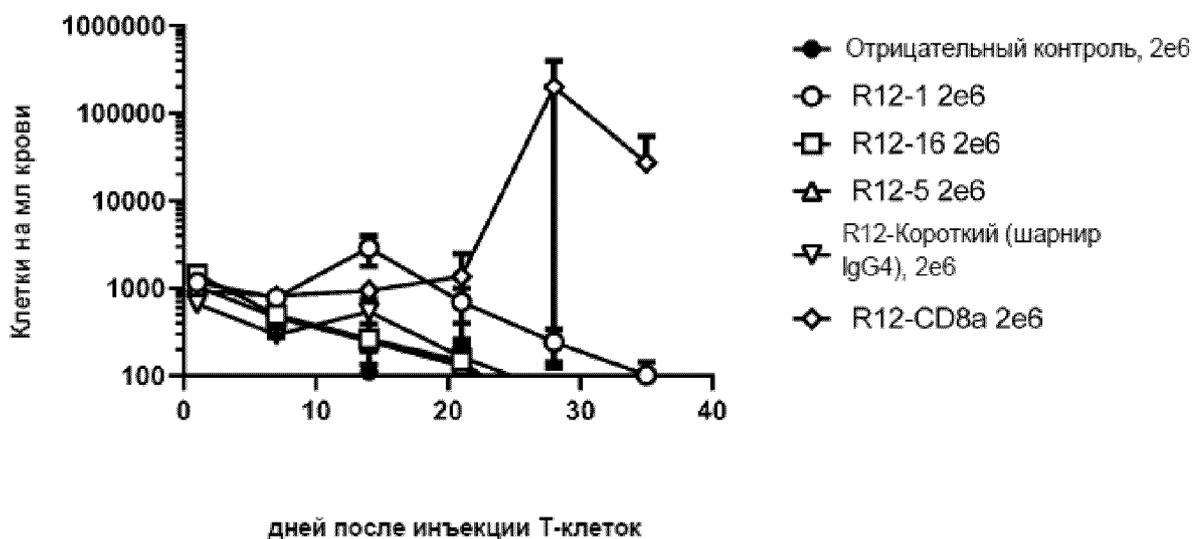
ФИГ. 84I

L0123 H1975 D3035586 ФК CD4+ в крови, Высокая доза



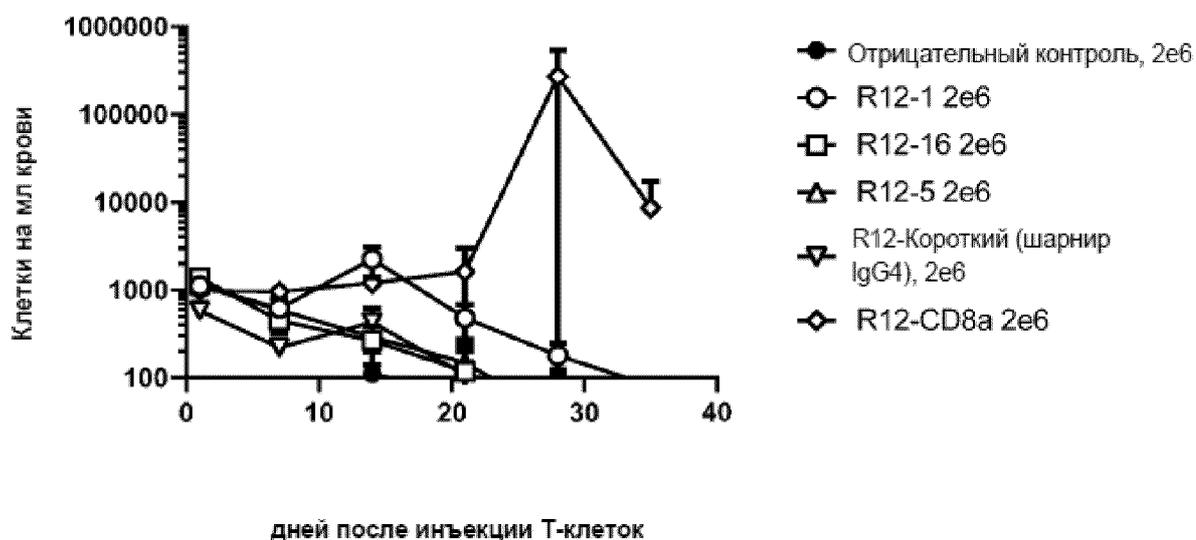
ФИГ. 84J

L0123 H1975 D3035586 ФК CD4+ EGFR+ в крови, Высокая доза



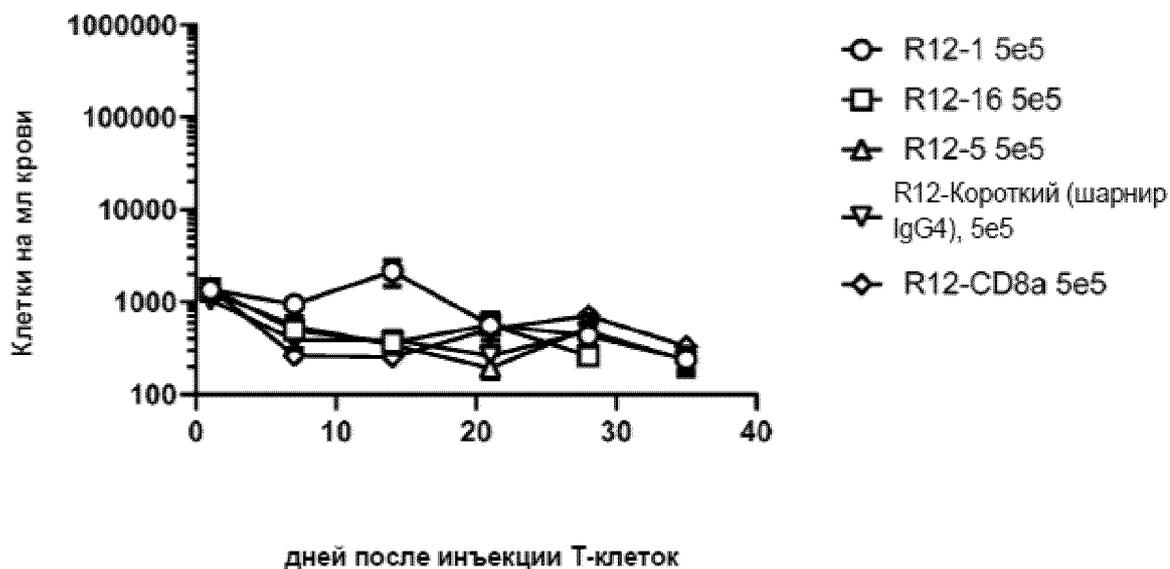
ФИГ. 84K

L0123 H1975 D3035586 ФК CD4+ CAR+ в крови, Высокая доза



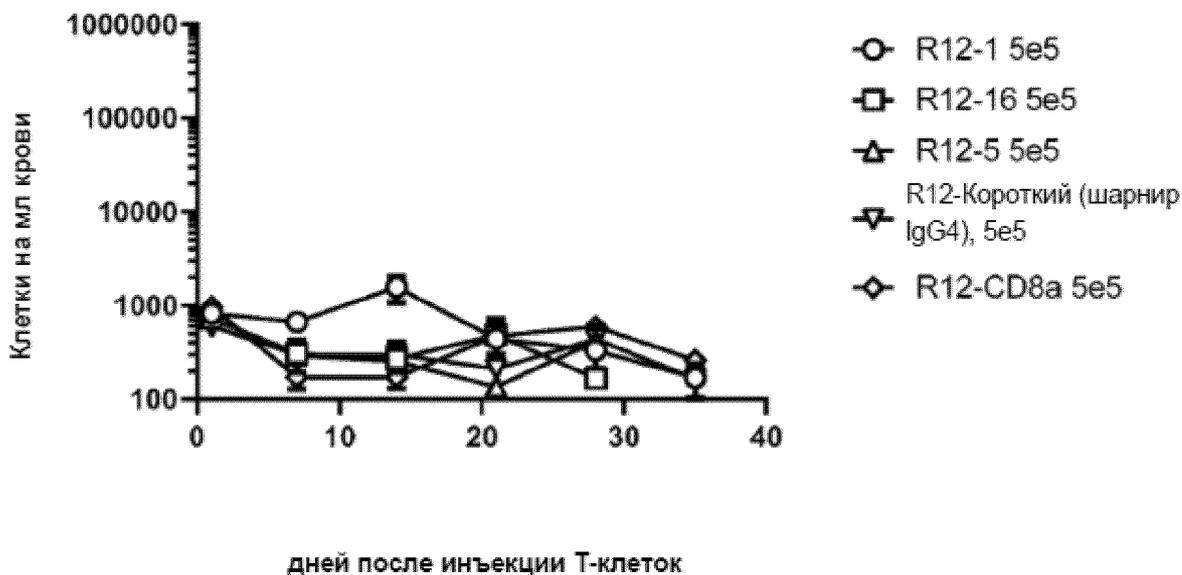
ФИГ. 84L

L0123 H1975 D3035586 ФК CD3+ в крови, Низкая доза



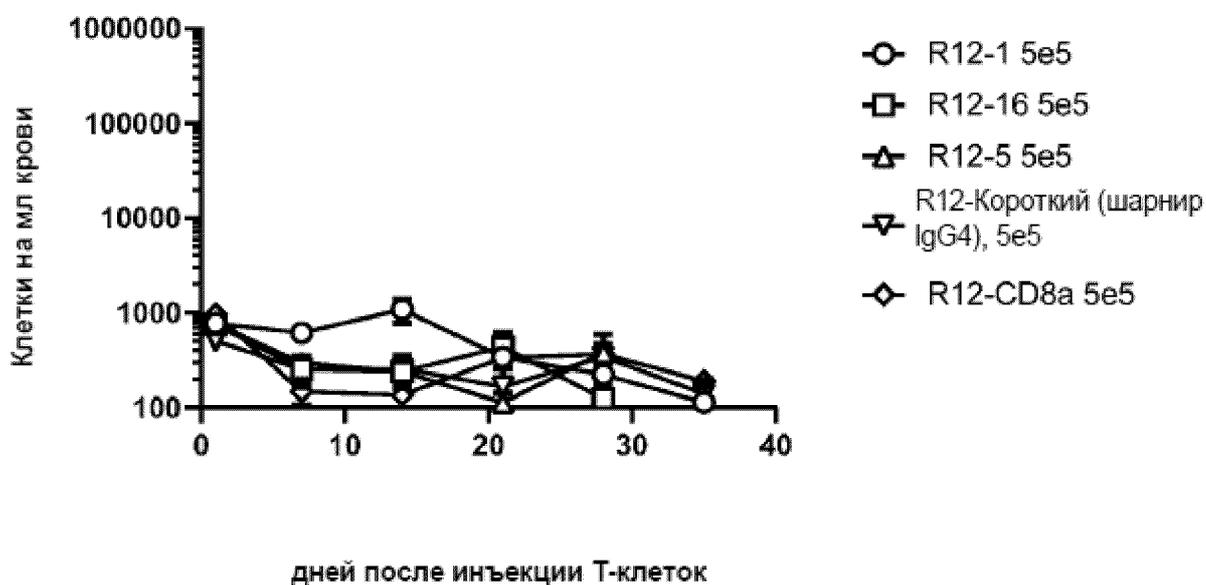
ФИГ. 85А

L0123 H1975 D3035586 ФК CD3+ EGFR+ в крови, Низкая доза



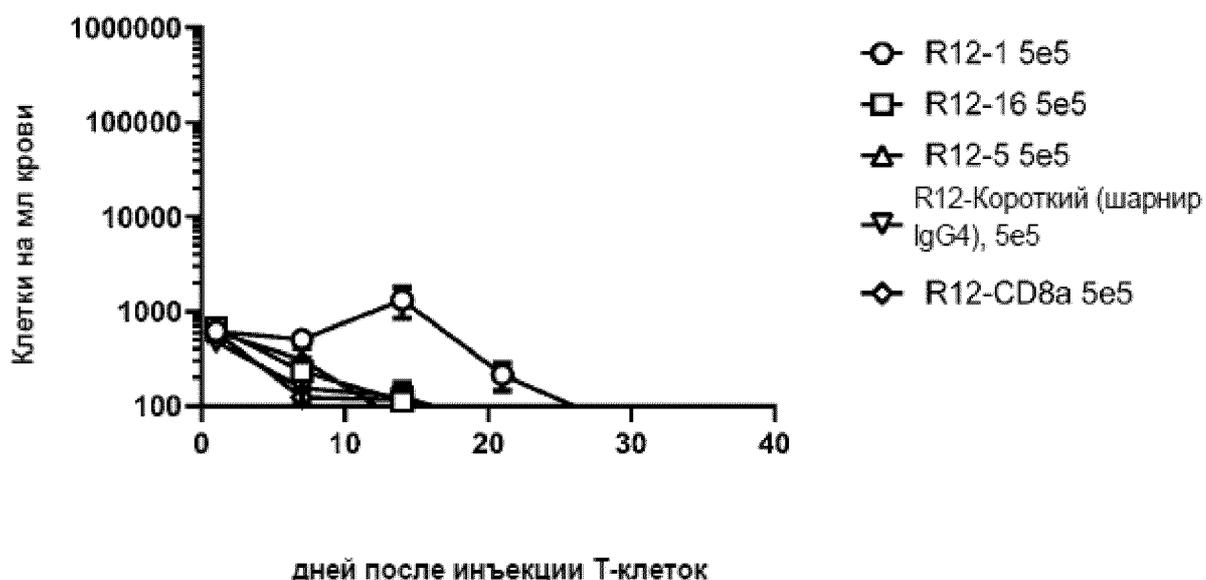
ФИГ. 85В

L0123 H1975 D3035586 ФК CD3+ CAR+ в крови, Низкая доза



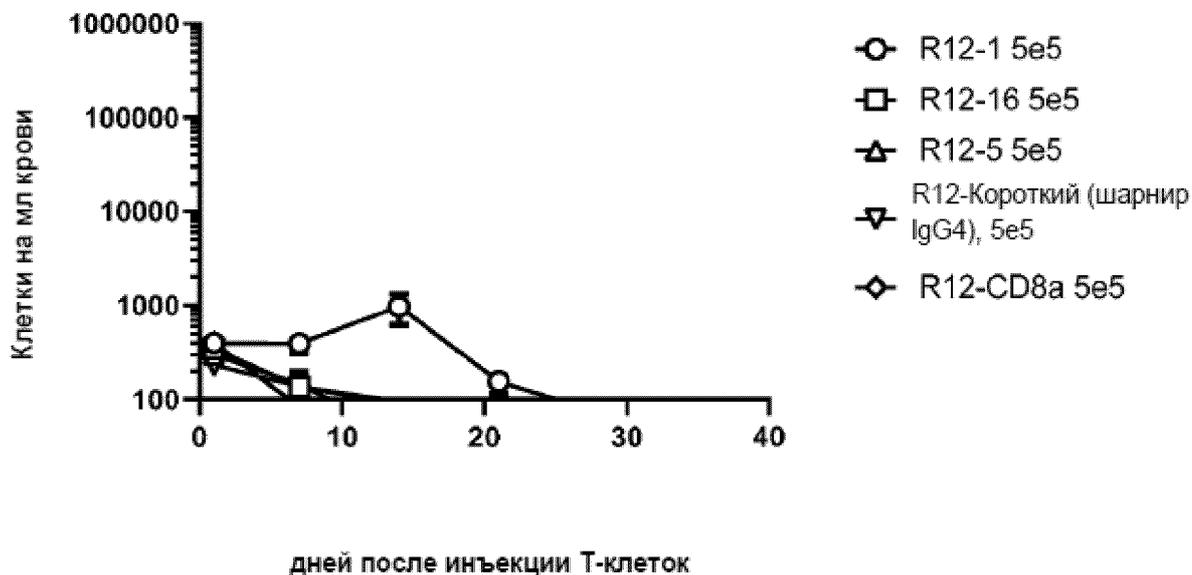
ФИГ. 85С

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+ в крови, Низкая доза



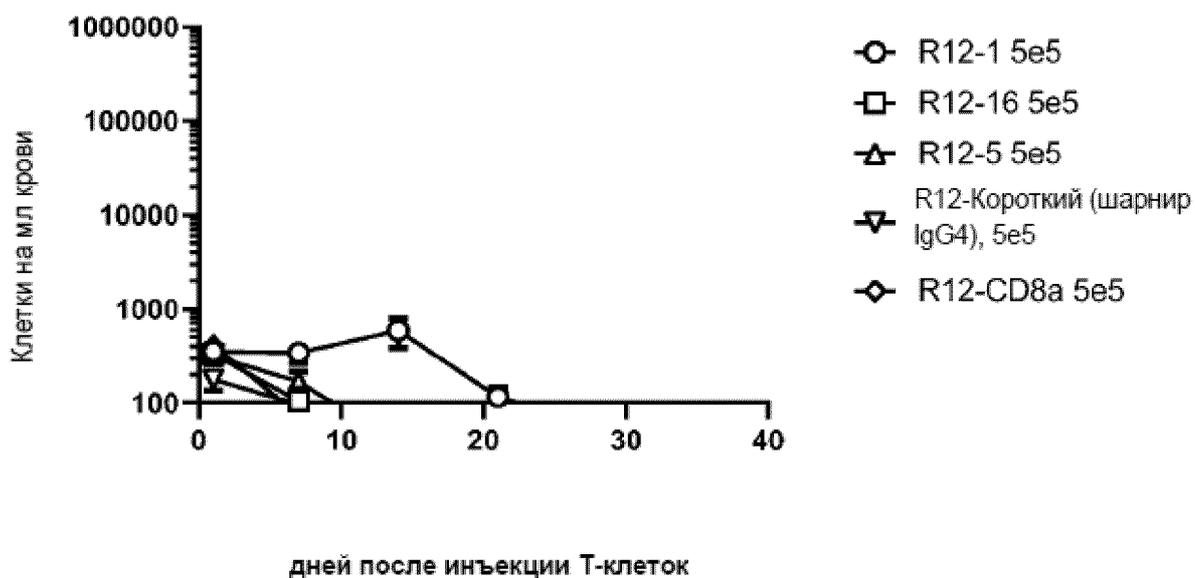
ФИГ. 85D

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+ EGFR+ в крови, Низкая доза



ФИГ. 85E

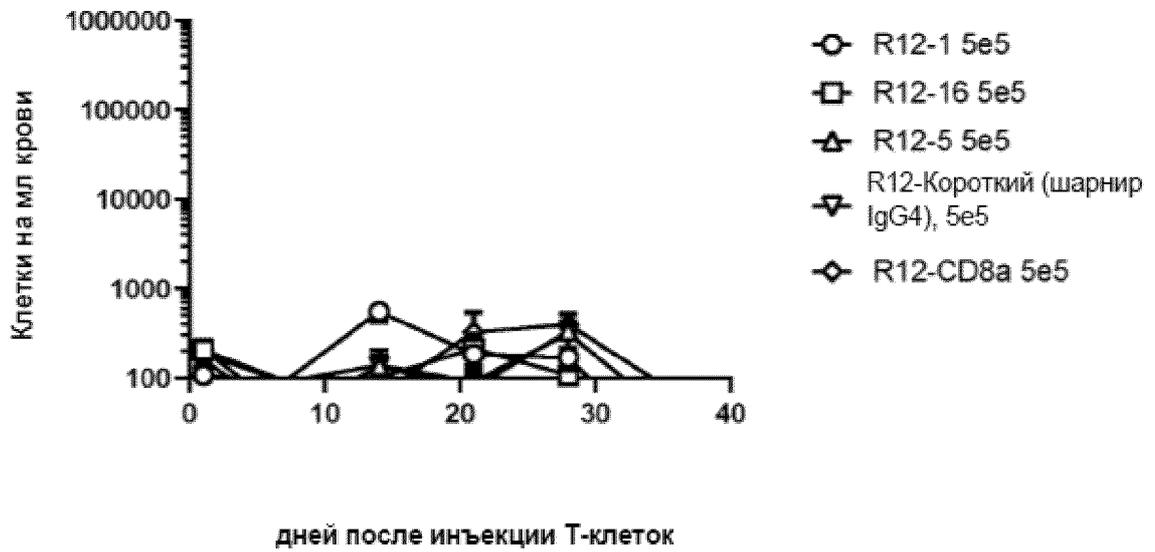
L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+ CAR+ в крови, Низкая доза



ФИГ. 85F

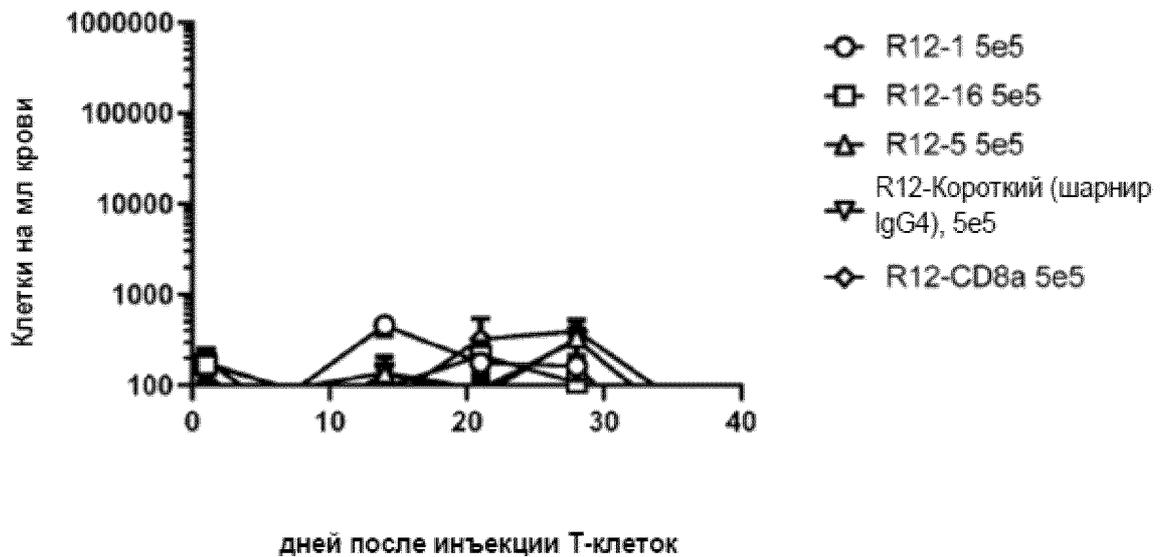
147/149

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+CD4+ в крови, Низкая доза



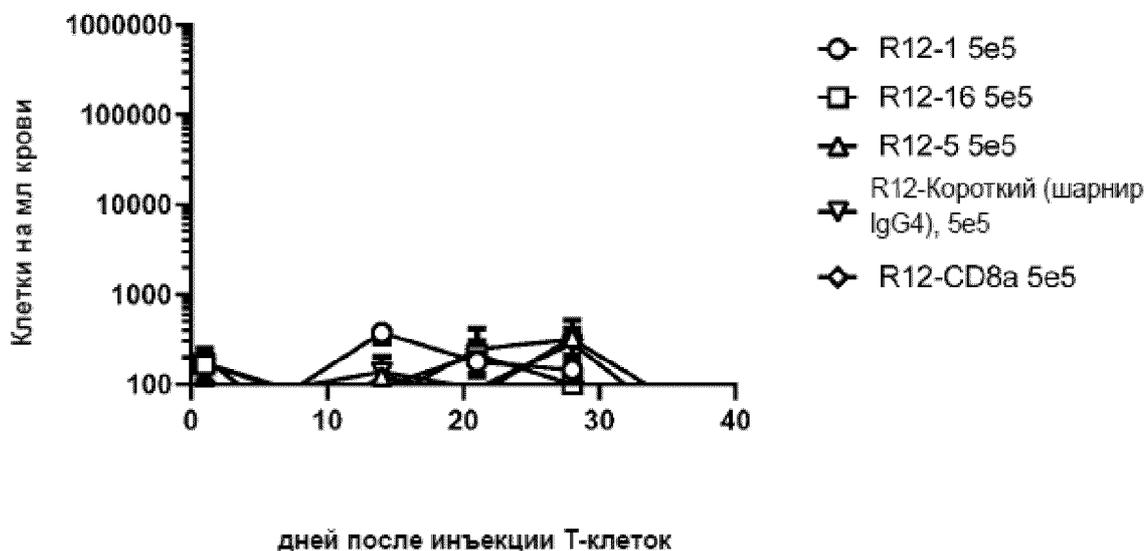
ФИГ. 85G

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+CD4+ EGFR+ в крови, Низкая доза



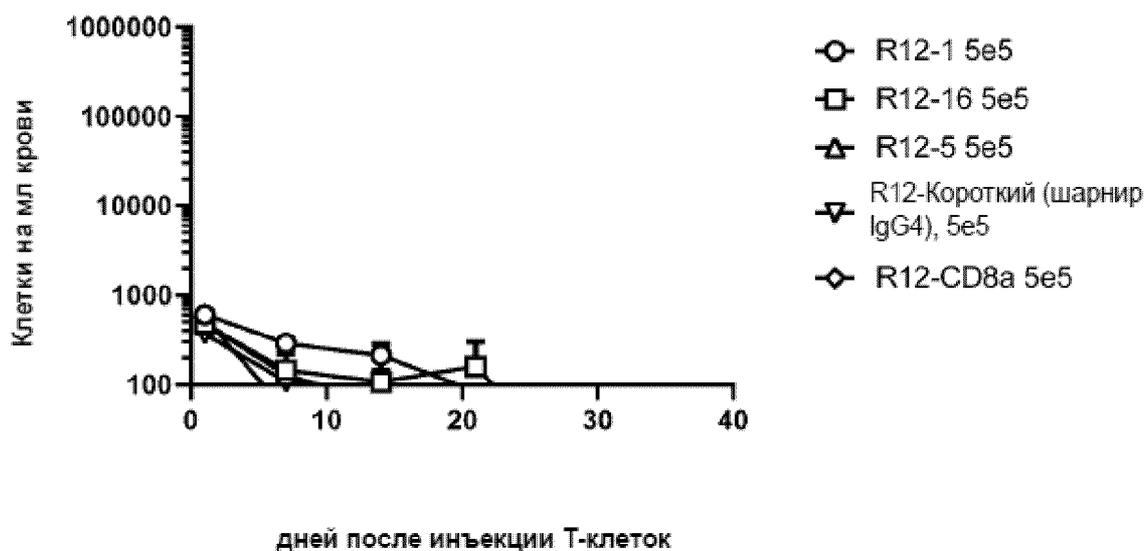
ФИГ. 85H

L0123 H1975 D3035586 ФК CD8+CD4+ CAR+ в крови, Низкая доза



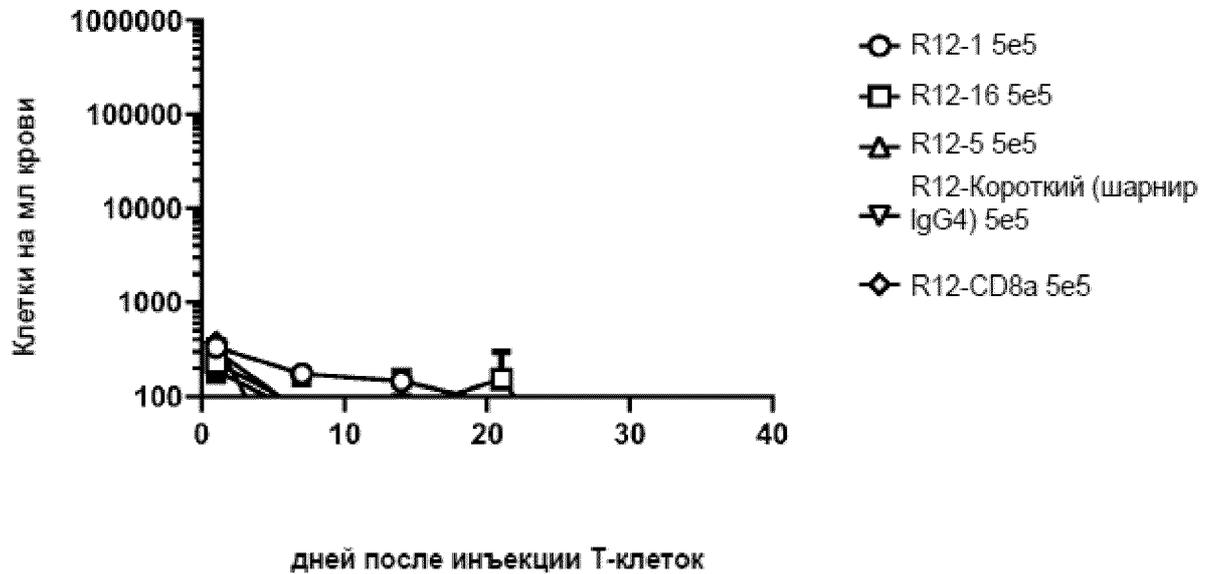
ФИГ. 85I

L0123 H1975 D3035586 ФК CD4+ в крови, Низкая доза



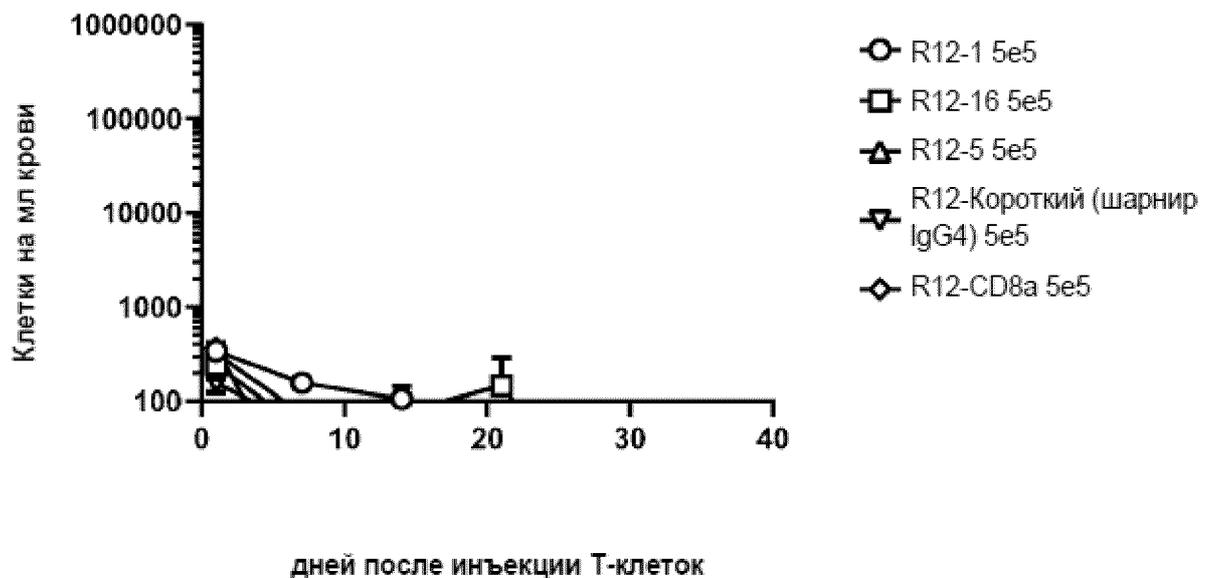
ФИГ. 85J

L0123 H1975 D3035586 ФК CD4+ EGFR+ в крови, Низкая доза



ФИГ. 85К

L0123 H1975 D3035586 ФК CD4+ CAR+ в крови, Низкая доза



ФИГ. 85L