

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092044** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.03.03

(22) Дата подачи заявки
2019.03.14

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) **ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ АНТИГЕНА ПРОТИВ CD33 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/643,015

(32) 2018.03.14

(33) US

(86) PCT/US2019/022309

(87) WO 2019/178382 2019.09.19

(71) Заявитель:

**ДЗЕ ЮНАЙТЕД СТЕЙТС ОФ
АМЕРИКА, ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ
ДЗЕ СЕКРЕТАРИ, ДЕПАРТМЕНТ
ОФ ХЕЛС ЭНД ХЬЮМАН
СЁРВИСЕЗ (US)**

(72) Изобретатель:

Цинь Хайин, Фрай Терри Дж. (US)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Согласно воплощениям данного изобретения предложены химерные рецепторы антигена (CAR), имеющие антигенную специфичность в отношении CD33. Раскрыты нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы, клетки-хозяева, популяции клеток и фармацевтические композиции, относящиеся к CAR. Также раскрыты способы выявления присутствия рака у млекопитающего и способы лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

A1

202092044

202092044

A1

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно воплощениям данного изобретения предложены химерные рецепторы антигена (CAR), содержащие антигенсвязывающий домен, специфичный в отношении CD33, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки. Согласно другому воплощению данного изобретения предложены конструкции CAR, содержащие аминокислотные последовательности, как описано в данном документе.

Согласно другим воплощениям данного изобретения предложены родственные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы, клетки-хозяева, популяции клеток и фармацевтические композиции, относящиеся к конструкциям CAR по изобретению.

Согласно дополнительным воплощениям изобретения предложены способы выявления присутствия рака у млекопитающего и способы лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A и 1B представляют диаграммы определенных воплощений CAR по изобретению. Mylo: Mylotarg – гуманизированное антитело hP67.6, нацеленное на человеческий CD33. M195: гуманизированное моноклональное мышинное антитело IgG2a (M195), нацеленное на человеческий CD33, от мыши, иммунизированной живыми человеческими лейкозными миелобластами. Hu195: гуманизированное антитело, нацеленное на человеческий CD33.

Фиг. 2A-2F представляют графики, показывающие эффективность трансдукции CAR.

Фиг. 3A и 3B представляют графики, показывающие анализ проточной цитометрией экспрессии антигена-мишени – CD33 и CD123 (показанной в виде интенсивности флуоресценции) – на лейкозных клетках.

Фиг. 4A-4F представляют графики, показывающие продукцию цитокинов Т-клетками с CAR CD33 и CD123 после стимуляции *in vitro*. Т-клетки, трансдуцированные CAR CD33 или CD123, инкубировали с лейкозными клетками-мишенями, как показано на Фиг. Уровень интерферона-гамма или IL-2 (интерлейкин-2) в супернатанте выявляли посредством ELISA.

Фиг. 5A-5C представляют графики анализа умерщвления IncuCyte. Т-клетки, трансдуцированные CAR CD33, инкубировали с лейкозными клетками-мишенями,

как показано на Фиг. Откладывали на графике различия живых лейкозных клеток относительно исходных, высаженных на чашку клеток.

Фиг. 5D и 5E представляют графики анализа умерщвления IncuCyte. Т-клетки, трансдуцированные CAR CD123, инкубировали с лейкозными клетками-мишенями, как показано на Фиг. Различия живых лейкозных клеток нормировали только к опухолевому контролю. 5D: умерщвление клетки MOLM14. 5E: умерщвление клеток THP1.

Фиг. 6A-6E представляют биолюминисцентные изображения, которые использовали для отслеживания развития лейкоза с разными обработками *in vivo*, как показано. CAR против CD19 не является специфичным по отношению к антигену CD33.

На Фиг. 7A показаны биолюминисцентные изображения, использованные для отслеживания развития лейкоза с разными обработками *in vivo*. 1 миллион PDX лейкозных клеток JMM117 инъецировали мышам NSG в сутки -7. Данных мышей обрабатывали Т-клетками с CAR в сутки 7.

Фиг. 7B и 7C представляют собой графики, на которых показаны (Фиг. 7B) человеческие клетки AML JMM117 и (Фиг. 7C) Т-клетки с CAR CD33 в селезенке в неделю два. Числа для обеих Фиг. являются такими, как представлено в легенде Фиг. 7B.

Фиг. 8 представляет собой график, показывающий анализ проточной цитометрией экспрессии антигена-мишени CD33 (показана как интенсивность флуоресценции) на лейкозных клетках. Сокращения являются такими, как описано в Примере 2.

Фиг. 9A и 9B представляют собой гистограммы, показывающие продукцию цитокинов Т-клетками с CAR CD33Hu195-CD28Z после стимулирования *in vitro*. Т-клетки, трансдуцированные CAR CD33Hu195-CD28Z, инкубировали с лейкозными клетками-мишенями, как показано на данной Фиг., в течение 16 часов. Уровень интерферона-гамма или IL-2 в супернатанте выявляли посредством ELISA.

На Фиг. 10 представлены биолюминисцентные изображения, которые использовали для отслеживания развития лейкоза с разными обработками *in vivo*, как показано. Один миллион лейкозных клеток MOLM14 инъецировали в сутки -7 мышам NSG. Мышей обрабатывали физиологическим раствором, оставляли необработанными или обрабатывали Т-клетками с CAR на 7 суток позднее (число клеток перечислено над колонками изображений). Более темные области представляют большую опухолевую нагрузку. «Шкала» относится к интенсивности флуоресценции, которая основывается на показанном интервале значения (если

данный интервал находится в низком значении, интенсивность флуоресценции будет выглядеть очень высокой, но если данный интервал находится в высоком значении, интенсивность будет выглядеть тусклой).

Фиг. 11А и 11В: подтверждение клинического вектора CD33Hu195-CD28z.

5 Фиг. 11А: выявление экспрессии CAR CD33 с использованием биотинилированного человеческого Siglec-3. Фиг. 11В: биолюминисцентное изображение, использованное для отслеживания развития лейкоза с разными обработками *in vivo*. Один миллион лейкозных клеток MOLM14 инъецировали в сутки 0 мышам NSG. Мышей обрабатывали 5Е6 Т-клеток с CAR в сутки 3.

10 Фиг. 12А-12С: эффекты костимулирующего домена CAR на клеточный метаболизм. Т-клетки с CAR CD33.2-28z и CD33.2-BBz совместно инкубировали с MOLM14, и через 7 суток анализировали на метаболические характеристики с использованием прибора Seahorse. Фиг. 12А (верхняя кривая представляет собой 5 суток-CD33.2-28, нижняя кривая представляет собой 5 суток-CD33.2-BB):
15 скорости потребления кислорода (OCR) Т-клетками с CAR CD33.2-28z и CD33.2-BBz в сутки 7 при базовых метаболических условиях и в ответ на митохондриальные ингибиторы. Фиг. 12В (слева - CD33.2-28, справа - CD33.2-BB): базовые уровни OCR относительно максимальных уровней дыхания. Фиг. 12С (слева - CD33.2-28, справа - CD33.2-BB): OCR для связанных с утечкой протонов и
20 связанных с продукцией АТФ.

Фиг. 12D-12F: эффекты костимулирующего домена CAR на клеточный энергетический фенотип. Т-клетки с CAR CD33.2-28z и CD33.2-BBz совместно инкубировали с MOLM14, и через 7 суток анализировали на клеточный энергетический фенотип с использованием прибора Seahorse (Фиг. 12D, левая
25 кривая представляет собой CD33.2-28, правая кривая представляет собой CD33.2-BB) Клеточный энергетический фенотип. (Фиг. 12Е, слева - CD33.2-28, справа - CD33.2-BB) Скорость потребления кислорода. (Фиг. 12F, слева - CD33.2-28, справа - CD33.2-BB) Скорость внеклеточного подкисления.

Фиг. 13 представляет биолюминисцентные изображения, которые
30 использовали для отслеживания развития лейкоза с разными обработками *in vivo*, как показано. Более темные области представляют большую опухолевую нагрузку.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

35 Острый миелоидный лейкоз (AML) представляет собой агрессивное злокачественное заболевание, которое обычно лечат с использованием

интенсивных цитотоксических химиотерапевтических схем с ограниченными альтернативными терапевтическими возможностями, когда данное заболевание становится трудно поддающимся лечению цитотоксической химиотерапией.

CAR представляет собой сконструированный искусственно гибридный белок или полипептид, содержащий антигенсвязывающий домен одного или более чем одного антитела (например, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv)), связанный с доменами сигнализации Т-клетки. Характеристики CAR включают их способность перенаправлять специфичность и реактивность Т-клетки в отношении выбранной мишени способом, не ограниченным МНС (главный комплекс гистосовместимости), используя антигенсвязывающие свойства моноклональных антител. Неограниченное МНС распознавание антигена дает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген независимо от процессинга антигена, таким образом, обходя главный механизм избегания опухоли. Кроме того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с альфа и бета цепями эндогенных рецепторов Т-клеток (TCR). Фразы «антигенная специфичность» и «индуцировать антигенспецифичный ответ» в том виде, в котором они используются в данном документе, означают то, что CAR может специфично связываться и иммунологически распознавать антиген, таким образом, что связывание CAR с данным антигеном индуцирует иммунный ответ.

CD33 экспрессируется на поверхности подавляющего большинства бластов AML и хронического миелоидного лейкоза при бластном кризе. Он также с нарушениями экспрессируется на поднаборе Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов. Нормальная экспрессия в ткани ограничивается нормальными миелоидными клетками.

Согласно одному воплощению данного изобретения предложен CAR, содержащий антигенсвязывающий домен против CD33 hP67.6 (Cowan et al., Front. Biosci. (Landmark Ed.), 18: 1311-1334 (2013) и патент США № 5739116, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки), M195 (Co et al., J. Immunol., 148: 1149-1154 (1992), включенный в данный документ посредством ссылки) или Hu195 (Co et al., выше). Данный антигенсвязывающий домен специфично связывается с CD33. В данном отношении в предпочтительном воплощении данного изобретения предложен CAR, содержащий антигенсвязывающий домен против CD33, содержащий, состоящий или по существу состоящий из одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) антигенсвязывающего домена hP67.6, M195 или Hu195.

Антигенсвязывающий домен против CD33 может содержать переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи, например, hP67.6. В одном воплощении данного изобретения переменная область тяжелой цепи содержит область CDR1, область CDR2 и область CDR3. В одном воплощении
5 данного изобретения переменная область легкой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 может содержать область CDR1 легкой цепи, область CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи.

Переменная область тяжелой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 может содержать, состоять или по существу состоять из аминокислотной
10 последовательности SEQ ID NO: 3. Переменная область легкой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 может содержать, состоять или по существу состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. Соответственно, в одном воплощении данного изобретения антигенсвязывающий домен против CD33 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую
15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. Предпочтительно антигенсвязывающий домен против CD33 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и 5.

Антигенсвязывающий домен против CD33 может содержать переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи, например, M195. В одном воплощении данного изобретения переменная область тяжелой цепи
20 содержит область CDR1, область CDR2 и область CDR3. В одном воплощении данного изобретения переменная область легкой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 может содержать область CDR1 легкой цепи, область CDR2 легкой цепи и область CDR3 легкой цепи.
25

Переменная область тяжелой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 может содержать, состоять или по существу состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13. Переменная область легкой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 может содержать, состоять или по
30 существу состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14. Соответственно, в одном воплощении данного изобретения антигенсвязывающий домен против CD33 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.
35 Предпочтительно антигенсвязывающий домен против CD33 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и 14.

Антигенсвязывающий домен против CD33 может содержать переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи, например Hu195. В одном воплощении данного изобретения переменная область тяжелой цепи содержит область CDR1, область CDR2 и область CDR3. В одном воплощении
5 данного изобретения переменная область легкой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 может содержать область CDR1 легкой цепи, область CDR2 легкой цепи и область CDR3 легкой цепи.

Переменная область тяжелой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 может содержать, состоять или по существу состоять из аминокислотной
10 последовательности SEQ ID NO: 15. Переменная область легкой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 может содержать, состоять или по существу состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16. Соответственно, в одном воплощении данного изобретения антигенсвязывающий домен против CD33 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую
15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. Предпочтительно антигенсвязывающий домен против CD33 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и 16.

В пределах Hu195 последовательность
20 SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPDFATYYCQ (SEQ ID NO: 31) может вместо того представлять собой SGVPSRFSGSGSGTDFLTNLSLQPDFATYYCQ (SEQ ID NO: 32). В пределах My10 последовательность AYMESSLRSEDATFYCYVNGNPWLA (SEQ ID NO: 33) может вместо того представлять собой AYMESSLRSEDATFYCYVNGNPWLA (SEQ ID NO: 34).

Антигенсвязывающий домен против CD33 может содержать антигенсвязывающую часть антитела против CD33. Данная антигенсвязывающая часть может представлять собой любую часть, которая имеет по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, как, например, Fab, F(ab')₂, dsFv, scFv, диатела и триатела. Предпочтительно данная антигенсвязывающая часть представляет
30 собой фрагмент антитела в виде одноцепочечного фрагмента переменной области (scFv). scFv представляет собой усеченный фрагмент Fab, включающий переменный (V) домен тяжелой цепи антитела, связанный с V доменом легкой цепи антитела через синтетический пептидный линкер, который может быть получен с использованием традиционных методик генной инженерии. Аналогичным
35 образом, фрагменты переменной области, стабилизированные дисульфидом (dsFv) могут быть получены посредством технологии генной инженерии.

В одном воплощении данного изобретения переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи антигенсвязывающего домена против CD33 могут быть связаны друг с другом посредством линкера. Данный линкер может содержать любую подходящую аминокислотную последовательность. В

5 одном воплощении данного изобретения линкер представляет собой Gly/Ser линкер из от примерно 1 до примерно 100, от примерно 3 до примерно 20, от примерно 5 до примерно 30, от примерно 5 до примерно 18 или от примерно 3 до примерно 8 аминокислот в длину и состоит из последовательных остатков глицина и/или серина. Соответственно, Gly/Ser линкер может состоять из остатков глицина

10 и/или серина. Предпочтительно Gly/Ser линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 17), и в пределах данного линкера могут присутствовать многочисленные SEQ ID NO: 17. В качестве спейсера между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом можно использовать любую линкерную последовательность.

15 В одном воплощении антигенсвязывающий домен против CD33 содержит переменную область легкой цепи, переменную область тяжелой цепи и линкер. В данном отношении одно воплощение антигенсвязывающего домена против CD33 содержит переменную область легкой цепи, переменную область тяжелой цепи, и линкер содержит, состоит или по существу состоит из всех SEQ ID NO: 3, 4

20 и 5; 13, 4 и 14; или 15, 4 и 16.

В одном воплощении антигенсвязывающий домен содержит одну или более чем одну лидерную последовательность (сигнальные пептиды). В одном воплощении данного изобретения данная лидерная последовательность может быть расположена на аминоконце CAR против CD33 в пределах конструкции CAR.

25 Данная лидерная последовательность может содержать любую подходящую лидерную последовательность, например, любой CAR, описанный в данном документе, может содержать любую лидерную последовательность, как описано в данном документе. В одном воплощении лидерная последовательность содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID

30 NO: 2 или SEQ ID NO: 12. В одном воплощении данного изобретения, в то время как лидерная последовательность может облегчать экспрессию высвобожденных CAR на поверхности клетки, присутствие лидерной последовательности в экспрессированном CAR не является необходимым для того, чтобы CAR функционировал. В одном воплощении изобретения при экспрессии CAR на

35 поверхности клетки данная лидерная последовательность может отщепляться. Соответственно, в одном воплощении изобретения высвобожденные CAR не

имеют лидерной последовательности. В одном воплощении изобретения CAR в пределах конструкции CAR не имеют лидерной последовательности.

В одном воплощении изобретения данная конструкция CAR содержит шарнирный домен. В одном воплощении изобретения данный шарнирный домен представляет собой шарнирный домен CD8. В предпочтительном воплощении шарнирный домен CD8 является человеческим. Предпочтительно шарнирный домен CD8 содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO: 6. В одном воплощении данного изобретения шарнирный домен представляет собой шарнирный домен CD28. В предпочтительном воплощении шарнирный домен CD28 является человеческим. Предпочтительно шарнирный домен CD28 содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO: 10.

В одном воплощении изобретения конструкция CAR содержит трансмембранный (TM) домен. В одном воплощении изобретения TM домен представляет собой TM домен CD8. В предпочтительном воплощении TM домен CD8 является человеческим. Предпочтительно TM домен CD8 содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO: 7. В одном воплощении изобретения TM домен представляет собой TM домен CD28. В предпочтительном воплощении TM домен CD28 является человеческим. Предпочтительно TM домен CD28 содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO: 11.

В одном воплощении изобретения конструкция CAR содержит внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки. В одном воплощении изобретения внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки содержит внутриклеточную последовательность сигнализации Т-клетки 4-1BB. 4-1BB, также известная как CD137, передает мощный костимулирующий сигнал на Т-клетки, стимулируя дифференциацию и усиливая долговременное выживание Т-лимфоцитов. Предпочтительно внутриклеточная последовательность сигнализации Т-клетки 4-1BB является человеческой. В предпочтительном воплощении внутриклеточная последовательность сигнализации Т-клетки 4-1BB содержит, состоит или по существу состоит из SEQ ID NO: 8.

В одном воплощении изобретения внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки содержит внутриклеточную последовательность сигнализации Т-клетки CD3 дзета (ζ). CD3 ζ ассоциирует с TCR с получением сигнала и содержит активационные мотивы иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). Предпочтительно внутриклеточная последовательность сигнализации Т-клетки CD3 ζ является человеческой. В предпочтительном воплощении внутриклеточная

последовательность сигнализации Т-клетки CD3 ζ содержит, состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

5 CAR, описанные в данном документе, могут быть получены в конструкциях, например, с саморасщепляемыми пептидами, как, например, конструкции CAR являются бицистронными, трицистронными и т.д. с CAR против CD19, CD22, TSLPR, CD123, FLT3 и т.д., где отдельные CAR высвобождаются при расщеплении данных пептидов.

На Фиг. 1 представлены схематические диаграммы типичных конструкций CAR согласно воплощениям данного изобретения.

10 Согласно дополнительным воплощениям изобретения предложены полноразмерные конструкции CAR, содержащие, состоящие или по существу состоящие из любой одной или более чем одной аминокислотной последовательности, изложенной в Таблицах 1-6 ниже.

Таблица 1 – CAR CD33Mylo-BBZ

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
M	1		исходный метионин
ALPVTALLLPLALLLHAARP	2		сигнальный пептид
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTITDSNIHWVRQAP GQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQ KFKNRATLTVDNPTNTAYMEL SSLRSEDYAFYYCVNGNPWL AYWGQGTLVTVSS	3	scFv против- CD33	тяжелая цепь
GGGGSGGGGSGGGGS	4	scFv против CD33	линкер
DIQLTQSPSTLSASVGRVTIT CRASESLDNYGIRFLTWFAQK PGKAPKLLMYAASNQSGVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQP DDFATYYCQQTKVEPWSFGQ GTKVEVKR	5	scFv против CD33	легкая цепь
TSSG	38		АК (аминокислоты), добавленные из-за клонирования
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACD	6	CD8	шарнир CD8альфа
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY C	7	CD8	трансмембранный домен CD8альфа
KRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L	8	4-1BB	внутриклеточный домен

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
RVKFSRSADAPAYKQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	9	CD3дзета	внутриклеточный домен

Таблица 2 – CAR CD33Mylo-CD28Z

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
M	1		исходный метионин
ALPVTALLLPLALLLHAARP	2		сигнальный пептид
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTITDSNIHWVRQAP GQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQ KFKNRATLTVDNPTNTAYMEL SSLRSEDYAFYYCVNGNPWL AYWGQGTLLVTVSS	3	scFv против CD33	тяжелая цепь
GGGGSGGGGSGGGGS	4	scFv против CD33	линкер
DIQLTQSPSTLSASVGRVTIT CRASESLDNYGIRFLTWVQK PGKAPKLLMYAASNQGSVGP SRFSGSGSGTEFTLTISLQP DDFATYYCQQTKVEPWSFGQ GTKVEVKR	5	scFv против CD33	легкая цепь
AAAEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKP	10	CD28	шарнир CD28
FWVLVVVGGVLAQYSLLVTVFA FIIFWVRSKRSRLLHSDYMN TPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRS	11	CD28	трансмембранный домен CD28
RVKFSRSADAPAYKQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	9	CD3дзета	внутриклеточный домен

Таблица 3 – CAR CD33M195-BBZ

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
M	1		исходный метионин

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
ALPVTALLLPLALLLHAARPMA LPVTALLLPLALLLHAARP	12		сигнальный пептид
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYNMHWWRQA PGQGLEWIGYIYPYNGGTGYN QKFKSKATITADESTNTAYMEL SSLRSEDVAVYYCARGRPAM DYWGQGTLVTVSS	13	scFv против CD33	тяжелая цепь
GGGGSGGGGSGGGGS	4	scFv против CD33	линкер
DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASESVDNYGISFMNWFQQ KPGKAPKLLIYAASNQGSQV SRFSGSGSGTDFTLNISLQ DDFATYYCQQSKEVPWTFGQ GTKVEIK	14	scFv против CD33	легкая цепь
TSSG	38		АК, добавленные из-за клонирования
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACD	6	CD8	шарнир CD8альфа
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY C	7	CD8	трансмембранный домен CD8альфа
KRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L	8	4-1BB	внутриклеточный домен
RVKFSRSADAPAYKQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	9	CD3дзета	внутриклеточный домен

Таблица 4 – CAR CD33M195-CD28Z

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
M	1		исходный метионин
ALPVTALLLPLALLLHAARPMA LPVTALLLPLALLLHAARP	12		сигнальный пептид
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYNMHWWRQA PGQGLEWIGYIYPYNGGTGYN QKFKSKATITADESTNTAYMEL SSLRSEDVAVYYCARGRPAM DYWGQGTLVTVSS	13	scFv против CD33	тяжелая цепь
GGGGSGGGGSGGGGS	4	scFv против CD33	линкер

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASESVDNYGISFMNWFQQ KPGKAPKLLIYAASNQGS SRFSGSGSGTDFTLNISLQ DDFATYYCQQSKEVPWTFGQ GTKVEIK	14	scFv против CD33	легкая цепь
TSSG	38		АК, добавленные из-за клонирования
AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFLPGPSKP	10	CD28	шарнир CD28
FWVLVVVGGVLA CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRS	11	CD28	трансмембранный домен CD28
RVKFSRSADAPAYKQGQNL YNELNLGRREEYDVLKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	9	CD3дзета	внутриклеточный домен

Таблица 5 – CAR CD33Hu195-BBZ

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
M	1		исходный метионин
ALPVTALLLPLALLLHAARP	2		сигнальный пептид
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYNMHWRQA PGQGLEWIGYIYPYNGGTGYN QKFKSKATITADESTNTAYMEL SSLRSEDVAVYYCARGRPAM DYWGQGTLLVTVSS	15	scFv против CD33	тяжелая цепь
GGGGSGGGGSGGGGS	4	scFv против CD33	линкер
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASESVDNYGISFMNWFQQ KPGKAPKLLIYAASNQGS SRFSGSGSGTDFTLTISLQ DDFATYYCQQSKEVPWTFGQ GTKVEIK	16	scFv против CD33	легкая цепь
SG	39		АК, добавленные из-за клонирования
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACD	6	CD8	шарнир CD8альфа
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY C	7	CD8	трансмембранный домен CD8альфа
KRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L	8	4-1BB	внутриклеточный домен

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
RVKFSRSADAPAYKQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	9	CD3дзета	внутриклеточный домен

Таблица 6 – CAR CD33Hu195-CD28Z

Последовательность	SEQ ID NO:	Сегмент	Примечания
M	1		исходный метионин
ALPVTALLLPLALLLHAARP	2		сигнальный пептид
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYNMHWWRQA PGQGLEWIGYIYPYNGGTGYN QKFKSKATITADESTNTAYMEL SSLRSEDVAVYYCARGRPAM DYWGQGTTLTVSS	15	scFv против CD33	тяжелая цепь
GGGGSGGGGSGGGGS	4	scFv против CD33	линкер
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASESVDNYGISFMNWFQQ KPGKAPKLLIYAASNQGSQV SRFSGSGSDFTLTISLQ DDFATYYCQQSKEVPWTFGQ GTKVEIK	16	scFv против CD33	легкая цепь
SG	39		АК, добавленные из-за клонирования
AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKP	10	CD28	шарнир CD28
FWWLVVVGGVLACYSLLVTV FIIFWVRSKRSRLHSDYMN TPRRPGPTRKHYQPYAPPRD FAAYRS	11	CD28	трансмембранный домен CD28
RVKFSRSADAPAYKQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	9	CD3дзета	внутриклеточный домен

5 Последовательности CDR показаны ниже жирным шрифтом с подчеркиванием.

Hu195 и M195:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV**SCKASGYTFTDYNMHWWRQA**PGQGLEWIGYI**YPYNGGTGYNQKFKSKA**TITADESTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCARG**RPAMDYWGQGT**
TLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**CRASESVDNYGISF**

MNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT|ISSLQPDDFATYYCQQ
SKEVPWTFGQGTKVEIKTSSG (SEQ ID NO: 35), где заключенный в рамку T Hu195
 представляет собой N для M195

CDR:

- 5 DYNMH (SEQ ID NO: 41)
 YIYPYNGGTGYNQKFKSKA (SEQ ID NO: 42)
 GRPAMDYWGQ (SEQ ID NO: 43)
 RASESVDNYGISFMN (SEQ ID NO: 44)
 AASNQGS (SEQ ID NO: 45)
 10 QQSKEVPWT (SEQ ID NO: 46)

Mylo:

- EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPY
NGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTL
 15 VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASEESLDNYGIRFLT
 WFQQKPGKAPKLLMYAASNQGSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQT
KEVPWSFGQGTKVEVKR (SEQ ID NO: 36)

CDR:

- GYTITDSN (SEQ ID NO: 47)
 20 IYPYNGGT (SEQ ID NO: 48)
 VNGNPWLAY (SEQ ID NO: 49)
 ESLDNYGIRF (SEQ ID NO: 50)
 AAS (SEQ ID NO: 51)
 QQTKEVPWS (SEQ ID NO: 52)

- 25 В одном воплощении конструкция CAR (обозначенная в данном документе
 CD33Mylo-BBZ) имеет следующую последовательность:

- MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNI
 HWRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTA
 FYYCVNGNPWLAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGD
 30 RVTITCRASESLDNYGIRFLTWVQQKPGKAPKLLMYAASNQGSVPSRFSGSGSGTEF
 TLTISSLQPDDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVKRTSSGTTTPAPRPPTPAPTIASQ
 PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYI
 FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN
 LGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
 35 RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 18).

В одном воплощении конструкция CAR (обозначенная в данном документе CD33Mylo-CD28Z) имеет следующую последовательность:

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNI
 HWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTA
 5 FYYCVNGNPWLAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGD
 RVTITCRASESLDNYGIRFLTWFFQQKPGKAPKLLMYAASNQSGVPSRFSGSGSGTEF
 TLTISSLQPDDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKEVEKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTII
 HVKKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM
 NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRR
 10 EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 19).

В одном воплощении конструкция CAR (обозначенная в данном документе CD33M195-BBZ) имеет следующую последовательность:

MALPVTALLLPLALLLHAARPMALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKK
 15 PGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHVWRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATIT
 ADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGSGG
 GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAA
 SNQSGVPSRFSGSGSGTDFTLNISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKEIKTS
 SGTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG
 20 VLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS
 RSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
 LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
 NO: 20).

В одном воплощении конструкция CAR (обозначенная в данном документе CD33M195-CD28Z) имеет следующую последовательность:

MALPVTALLLPLALLLHAARPMALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKK
 PGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHVWRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATIT
 ADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGSGG
 GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAA
 30 SNQSGVPSRFSGSGSGTDFTLNISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKEIKTS
 SGAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVWVGGVLACYS
 LLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSR
 SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
 35 NO: 21).

В одном воплощении конструкция CAR (обозначенная в данном документе CD33Hu195-BBZ) имеет следующую последовательность:

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYN
 MHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDY
 5 AVYYCARGRPAMDYWGQGLTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVITICRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPL
 SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFK
 QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG
 10 RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
 KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 22).

В одном воплощении конструкция CAR (обозначенная в данном документе CD33Hu195-CD28Z) имеет следующую последовательность:

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYN
 15 MHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDY
 AVYYCARGRPAMDYWGQGLTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVITICRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKSGAAAIEVMYPPPYLDNEKSN
 GTIIHVKGKHLCPSPFLFPGSPKFWLWVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS
 20 DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQGGQNQLYNELNL
 GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
 GKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 23). Q в
 RVKFSRSADAPAYQ (SEQ ID NO: 37) может быть заменен на K.

Последовательность GS может находиться на С-конце любого CAR,
 25 описанного в данном документе.

В объем данного изобретения включаются функциональные части
 конструкций CAR по изобретению, описанных в данном документе. Термин
 «функциональная часть», при использовании по отношению к CAR, относится к
 любой части или фрагменту конструкций CAR по изобретению, которая сохраняет
 30 биологическую активность конструкции CAR, частью которой она является
 (родительская конструкция CAR). Функциональные части охватывают, например, те
 части конструкции CAR, которые сохраняют способность распознавать клетки-
 мишени или выявлять, лечить или предупреждать рак в аналогичной степени,
 такой же степени или большей степени, что и родительская конструкция CAR. В
 35 связи с родительской конструкцией CAR функциональная часть может содержать,

например, примерно 10%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 50%, примерно 68%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95% или более родительского CAR.

Функциональная часть может содержать дополнительные аминокислоты на амино- или карбоксильном конце данной части или на обоих концах, причем
5 дополнительные аминокислоты не обнаруживаются в аминокислотной последовательности родительской конструкции CAR. Желательно дополнительные аминокислоты не препятствуют биологической функции функциональной части, например, распознаванию клеток-мишеней, выявлению рака, лечению или предупреждению рака и т.д. Более желательно дополнительные аминокислоты
10 увеличивают биологическую активность по сравнению с биологической активностью родительской конструкции CAR.

Включенными в объем данного изобретения являются функциональные варианты конструкций CAR по изобретению, описанных в данном документе. Термин «функциональный вариант» в том виде, в котором он используется в
15 данном документе, относится к конструкции CAR, полипептиду или белку, имеющему существенную или значительную идентичность или сходство последовательности с родительской конструкцией CAR, причем функциональный вариант сохраняет биологическую активность CAR, вариантом которого он является. Функциональные варианты охватывают, например, те варианты
20 конструкции CAR, описанные в данном документе (родительской конструкции CAR), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в аналогичной степени, такой же степени или большей степени, что и родительская конструкция CAR. В связи с родительской конструкцией CAR функциональный вариант, например, может быть по меньшей мере примерно на 30%, примерно 50%,
25 примерно 75%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или более идентичным по аминокислотной последовательности родительской конструкции CAR.

Функциональный вариант, например, может содержать аминокислотную
30 последовательность родительского CAR с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. Альтернативно или дополнительно, функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность родительской конструкции CAR с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В данном случае для неконсервативной аминокислотной замены
35 предпочтительно не препятствовать или не ингибировать биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена

может усиливать биологическую активность функционального варианта таким образом, что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с родительской конструкцией CAR.

Аминокислотные замены конструкций CAR по изобретению
5 предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. Консервативные аминокислотные замены известны в данной области и включают аминокислотные замены, в которых одна аминокислота, имеющая определенные физические и/или химические свойства, заменяется другой аминокислотой, которая имеет такие же или аналогичные химические или физические свойства.
10 Например, консервативная аминокислотная замена может представлять собой кислотную/отрицательно заряженную полярную аминокислоту, замененную другой кислотной/отрицательно заряженной полярной аминокислотой (например, Asp или Glu), аминокислоту с неполярной боковой цепью, замененную другой аминокислотой с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met,
15 Phe, Pro, Trp, Cys, Val и т.д.), основную/положительно заряженную полярную аминокислоту, замененную другой основной/положительно заряженной полярной аминокислотой (например, Lys, His, Arg и т.д.), незаряженную аминокислоту с полярной боковой цепью, замененную другой незаряженной аминокислотой с полярной боковой цепью (например, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr и т.д.), аминокислоту с
20 бета-разветвленной боковой цепью, замененную другой аминокислотой с бета-разветвленной боковой цепью (например, Ile, Thr и Val), аминокислоту с ароматической боковой цепью, замененную другой аминокислотой с ароматической боковой цепью (например, His, Phe, Trp и Tyr) и т.д.

Данная конструкция CAR может по существу состоять из определенной
25 аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, таким образом, что другие компоненты, например, другие аминокислоты, существенно не изменяют биологическую активность функционального варианта.

Конструкции CAR воплощений данного изобретения (включающие
30 функциональные части и функциональные варианты) могут быть любой длины, т.е. могут содержать любое число аминокислот, при условии, что данные конструкции CAR (или их функциональные части, или функциональные варианты) сохраняют их биологическую активность, например, способность специфически связываться с антигеном, выявлять больные клетки у млекопитающего или лечить, или
35 предупреждать заболевание у млекопитающего и т.д. Например, CAR может быть от примерно 50 до примерно 5000 аминокислот в длину, как, например, 50, 70, 75,

100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более аминокислот в длину.

Конструкции CAR воплощений данного изобретения (включающие функциональные части и функциональные варианты по изобретению) могут
5 содержать синтетическую аминокислоту вместо одной или более чем одной встречающейся в природе аминокислоты. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области и включают, например, аминокислоты карбоновые кислоты, норлейцин, α -амино-*n*-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометил-цистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β -фенилсерин, β -гидроксифенилаланин, фенилглицин, α -нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метиллизин, N',N'-дибензиллизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α -аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогептанкарбоновую кислоту, α -(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту, α,γ -диаминомасляную кислоту, α,β -диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и α -трет-бутилглицин.

20 Конструкции CAR воплощений данного изобретения (включающие функциональные части и функциональные варианты) могут быть гликозилированными, амидированными, карбоксилированными, фосфорилированными, этерифицированными, N-ацилированными, циклизированными, например, посредством дисульфидного мостика или
25 превращенными в соль присоединения кислоты и/или возможно димеризованными или полимеризованными, или конъюгированными.

Конструкции CAR воплощений данного изобретения (включающие их функциональные части и функциональные варианты) могут быть получены способами, известными в данной области. Данные конструкции CAR могут быть
30 получены любым подходящим способом получения полипептидов или белков, включая синтез *de novo*. Также данные конструкции CAR могут быть получены рекомбинантно с использованием нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, с использованием стандартных способов генной инженерии. См., например, Green et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring
35 Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2012. Кроме того, части некоторых

конструкций CAR по изобретению (включающие их функциональные части и функциональные варианты) могут быть выделены и/или очищены из такого источника, как растение, бактерия, насекомое, млекопитающее, например, крыса, человек и т.д. Способы выделения и очистки хорошо известны в данной области. В качестве альтернативы, конструкции CAR, описанные в данном документе (включая их функциональные части и функциональные варианты) могут быть синтезированы на заказ компаниями, такими как Synper (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) и Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). В данном отношении конструкции CAR по изобретению могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

Кроме того, согласно воплощению данного изобретения предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из конструкций CAR, описанных в данном документе (включая их функциональные части и функциональные варианты). Нуклеиновые кислоты по изобретению могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую любые из лидерных последовательностей, антигенсвязывающих доменов, трансмембранных доменов, линкеров и/или внутриклеточных доменов сигнализации Т-клеток, описанных в данном документе.

В одном воплощении данная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует любую конструкцию CAR, описанную в данном документе. В одном воплощении изобретения данная нуклеиновая может содержать, состоять или по существу состоять из нуклеотидной последовательности любого из следующих.

25 CAR CD33Mylo-BBZ

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCCTGGCTCTGCTGCTGCAT
 GCCGCCAGACCTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCG
 GCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCATCACCGACAGCAA
 CATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCCAGAGCCTGGAATGGATCGGCTACATC
 30 TACCCCTACAACGGCGGCACCGACTACAACCAGAAGTTCAAGAACCGGGCCACCC
 TGACCGTGGACAACCCACCAACACCGCCTACATGGAAGTGGAGCAGCCTGCGGAG
 CGAGGACACCGCCTTCTACTACTGCGTGAACGGCAACCCCTGGCTGGCCTACTGG
 GGCCAGGGAACCCTGGTGCAGTGTCTAGCGGCGGAGGCGGATCTGGAGGGGGA
 GGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCACCCCTG
 35 AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTGGGCCAGCGAGAGCCTG
 GACAACCTACGGCATCCGGTTTCTGACCTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCC

CCAAGCTGCTGATGTACGCCGCCAGCAATCAGGGCAGCGGCGTGCCCAGCAGATT
 CAGCGGCTCTGGCAGCGGAACCGAGTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCC
 GACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGACCAAAGAGGGTGCCCTGGTCCTTCG
 GCCAGGGCACCAAGGTGGAAGTGAAGCGGACTAGTTCGGGAACCACGACGCCAGC
 5 GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCG
 CCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGG
 ACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTT
 CTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTAT
 ATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT
 10 AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAG
 CAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG
 CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGG
 ACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA
 TGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGC
 15 GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC
 ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ
 ID NO: 24)

CAR CD33Mylo-CD28Z

20 ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCCTGGCTCTGCTGCTGCAT
 GCCGCCAGACCTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCG
 GCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCATCACCGACAGCAA
 CATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCCAGAGCCTGGAATGGATCGGCTACATC
 TACCCCTACAACGGCGGCACCGACTACAACCAGAAGTTCAAGAACCGGGCCACCC
 25 TGACCGTGGACAACCCACCAACACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAG
 CGAGGACACCGCCTTCTACTACTGCGTGAACGGCAACCCCTGGCTGGCCTACTGG
 GGCCAGGGAACCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGAGGCGGATCTGGAGGGGGA
 GGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCACCCCTG
 AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGGCCAGCGAGAGCCTG
 30 GACAACTACGGCATCCGGTTTCTGACCTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCC
 CCAAGCTGCTGATGTACGCCGCCAGCAATCAGGGCAGCGGCGTGCCCAGCAGATT
 CAGCGGCTCTGGCAGCGGAACCGAGTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCC
 GACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGACCAAAGAGGGTGCCCTGGTCCTTCG
 GCCAGGGCACCAAGGTGGAAGTGAAGCGGACTAGTTCGGAGCCGCCGCCATCG
 35 AAGTGATGTACCCCTCCCTACCTGGATAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATC
 CACGTGAAGGGAAAGCACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGC

CCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGCGGAGTGCTGGCCTGCTACAGCCTCCTGGT
GACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGGAGCAAGAGGTCCAGGCTGCTGCAC
AGCGACTACATGAATATGACCCCCAGAAGGCCCGGCCACCAGAAAGCACTATCA
GCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTTGCCGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGC
5 AGATCCGCCGATGCCCTGCTTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAGC
TGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAATACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGG
ACCCCGAGATGGGCGGAAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCGAGGAGGGCCTGTACA
ATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGG
CGAGAGGAGGAGGGGCAAGGGCCATGACGGCCTGTACCAAGGCCTGTCCACCGC
10 CACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCCAGGGGATCC
TAA (SEQ ID NO: 25)

CAR CD33M195-BBZ

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCCTGGCTCTGCTGCTGCAT
15 GCCGCCAGACCTATGGCTCTGCCCGTGACCGCTCTCCTCCTGCCACTGGCACTGC
TCCTCCACGCTGCTAGACCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAA
GAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACC
GACTACAACATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATCG
GCTACATCTACCCCTACAACGGCGGCACCGGCTACAACCAGAAGTTCAAGAGCAAG
20 GCCACCATCACCGCCGACGAGAGCACCAACACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCC
TGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGCAGACCCGCCATGG
ACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGCTCTG
GCGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGCGGCAGCGATATCCAGATGACCCAGAGCCCCA
GCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCAGCG
25 AGAGCGTGGACAACACTACGGCATCAGCTTCATGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCCGG
CAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAATCAGGGCAGCGGCGTGCC
AGCAGATTCAGCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAACATCAGCAGCC
TGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAAAGAGGTGCCCTG
GACCTTCGGACAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGACTAGTTCCGGAACCACGACG
30 CCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCC
CTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGACACGAGGGG
GCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGG
GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTC
CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGAT
35 GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAA
GTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT

AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG
CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT
GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA
AAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA
5 CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTA
A (SEQ ID NO: 26)

CAR CD33M195-CD28Z

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCCTGGCTCTGCTGCTGCAT
10 GCCGCCAGACCTATGGCTCTGCCCGTGACCGCTCTCCTCCTGCCACTGGCACTGC
TCCTCCACGCTGCTAGACCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAA
GAAACCCCGCAGCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACC
GACTACAACATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATCG
GCTACATCTACCCCTACAACGGCGGCACCGGCTACAACCAGAAGTTCAAGAGCAAG
15 GCCACCATCACCGCCGACGAGAGCACC AACACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCC
TGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGCAGACCCGCCATGG
ACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGCAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGCTCTG
GCGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGCGGCAGCGATATCCAGATGACCCAGAGCCCCA
GCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGGCCAGCG
20 AGAGCGTGGACAACACTACGGCATCAGCTTCATGAACTGGTTCAGCAGAAGCCCGG
CAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAATCAGGGCAGCGGCGTGCC
AGCAGATTCAGCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAACATCAGCAGCC
TGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAAAGAGGTGCCCTG
GACCTTCGACAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGACTAGTTCCGGAGCCGCGGCC
25 ATCGAAGTGATGTACCCCCCTCCCTACCTGGATAACGAGAAGAGCAACGGCACCAT
CATCCACGTGAAGGGAAAGCACCTGTGTCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGC
AAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGCGGAGTGCTGGCCTGCTACAGCCTCC
TGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGGAGCAAGAGGTCCAGGCTGCT
GCACAGCGACTACATGAATATGACCCCCAGAAGGCCCGGCCCCACCAGAAAGCAC
30 TATCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTTGCCGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGT
TCAGCAGATCCGCGGATGCCCTGCTTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAAC
GAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAATACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGA
AGGGACCCCGAGATGGGCGGAAAGCCCAGGAGGAAGAACCCTCAGGAGGGCCTG
TACAATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGA
35 AGGGCGAGAGGAGGAGGGGGCAAGGGCCATGACGGCCTGTACCAAGGCCTGTCCA

CCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCCAGGGG
ATCCTAA (SEQ ID NO: 27)

CAR CD33Hu195-BBZ

5 ATGGCTCTGCCCCTCACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCAC
GCCGCCAGACCTCAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAACCTG
GCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACTACAA
CATGCACTGGGTGAGGCAAGCCCCTGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATC
TACCCTTACAACGGCGGCACAGGCTACAACCAGAAGTTCAAGTCCAAGGCCACCAT
10 CACCGCCGATGAGTCCACCAATACCGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGGTCC
GAGGACACAGCCGTCTACTACTGCGCCAGGGGCAGGCCCGCTATGGACTACTGGG
GCCAGGGCACCCCTGGTGCAGTGAGCTCTGGTGGCGGCGGATCCGGCGGCGGCG
GCAGCGGCGGCGGCGGCTCCGACATTCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGA
GCGCTTCCGTGGGAGACAGGGTGACCATCACATGCAGGGCCTCCGAGAGCGTGGA
15 CAATTACGGCATCAGCTTCATGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCA
AACTGCTGATCTATGCCGCCAGCAATCAGGGCTCCGGCGTGCTAGCAGGTTTTCC
GGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCTGACG
ATTTCCGCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAAGGAGGTGCCTTGGACCTTTGGACAG
GGCACAAAGGTGGAGATCAAGTCCGGAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA
20 CACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCC
GGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATA
TCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTT
ATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA
TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA
25 GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACG
CCCCCGCTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACG
AAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG
GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAG
ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG
30 GCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO: 28)

CAR CD33Hu195-CD28Z

35 ATGGCTCTGCCCCTCACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCAC
GCCGCCAGACCTCAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAACCTG
GCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACTACAA

CATGCACTGGGTGAGGCAAGCCCCTGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATC
TACCCTTACAACGGCGGCACAGGCTACAACCAGAAGTTCAAGTCCAAGGCCACCAT
CACCGCCGATGAGTCCACCAATACCGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGGTCC
GAGGACACAGCCGTCTACTACTGCGCCAGGGGCAGGCCCGCTATGGACTACTGGG
5 GCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCTCTGGTGGCGGCGGATCCGGCGGCGGCG
GCAGCGGCGGCGGCGGCTCCGACATTCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGA
GCGCTTCCGTGGGAGACAGGGTGACCATCACATGCAGGGCCTCCGAGAGCGTGGA
CAATTACGGCATCAGCTTCATGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCA
AACTGCTGATCTATGCCGCCAGCAATCAGGGCTCCGGCGTGCCTAGCAGGTTTTCC
10 GGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCTGACG
ATTTCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCAAGGAGGTGCCTTGGACCTTTGGACAG
GGCACAAAGGTGGAGATCAAGTCCGGAGCCGCCCATCGAAGTGATGTACCCCC
CTCCCTACCTGGATAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGAAAG
CACCTGTGTCCCAGCCCCCTGTTTCCCGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGT
15 GGTGGTCGGCGGAGTGCTGGCCTGCTACAGCCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATC
ATCTTCTGGGTGAGGAGCAAGAGGTCCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAATAT
GACCCCCAGAAGGCCCGGCCCCACCAGAAAGCACTATCAGCCCTACGCCCCCCC
AGGGACTTTGCCGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGATGCCC
CTGCTTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAG
20 GGAGGAATACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGACCCCGAGATGGGCGG
AAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAAGAC
AAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGGAGGGGGC
AAGGGCCATGACGGCCTGTACCAAGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACG
ACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCCAGGGGATCCTAA (SEQ ID NO: 29)

25

Термин «молекула нуклеиновой кислоты» в том виде, в котором он
используется в данном документе, включает «полинуклеотид», «олигонуклеотид» и
«молекулу нуклеиновой кислоты», и, в общем, означает полимер ДНК или РНК,
который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, синтезированным или
30 полученным (например, выделенным и/или очищенным) из природных источников,
который может содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды,
и который может содержать природную, неприродную или измененную
межнуклеотидную связь, такую как фосфоамидатная связь или
фосфоротиоатная связь вместо фосфодиэфирной связи, находящейся между
35 нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида. В некоторых воплощениях
данная нуклеиновая кислота не содержит каких-либо вставок, делеций, инверсий

и/или замен. Однако в некоторых случаях может быть подходящим, чтобы нуклеиновая кислота содержала одну или более чем одну вставку, делецию, инверсию и/или замену, как обсуждалось в данном документе. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота может кодировать дополнительные аминокислотные последовательности, которые не влияют на функцию конструкции CAR, и которые могут транслироваться, или могут не транслироваться при экспрессии данной нуклеиновой кислоты клеткой-хозяином.

В одном воплощении любая нуклеотидная последовательность в данном документе может быть оптимизирована по кодонам. Не желая быть связанными конкретной теорией или механизмом, считается, что оптимизация кодонов нуклеотидной последовательности увеличивает эффективность трансляции транскриптов мРНК. Оптимизация кодонов нуклеотидной последовательности может включать замену природного кодона другим кодоном, который кодирует ту же самую аминокислоту, но может транслироваться тРНК, которая является более легкой доступной в клетке, таким образом, увеличивая эффективность трансляции. Оптимизация нуклеотидной последовательности также может уменьшать вторичные структуры мРНК, которые препятствовали бы трансляции, таким образом, увеличивая эффективность трансляции. В одном воплощении изобретения нуклеотидная последовательность с оптимизированными кодонами может содержать, состоять или по существу состоять из любой из последовательностей нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Нуклеиновые кислоты по воплощению данного изобретения могут быть рекомбинантными. Термин «рекомбинантный» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к (i) молекулам, которые конструируются вне живых клеток посредством соединения отрезков природной или синтетической нуклеиновой кислоты с молекулами нуклеиновой кислоты, которые могут реплицироваться в живой клетке, или (ii) молекулам, которые возникают из-за репликации молекул, описанных в (i) выше. Для целей данного документа репликация может представлять собой репликацию *in vitro* или репликацию *in vivo*.

Рекомбинантной нуклеиновой кислотой может быть нуклеиновая кислота, которая имеет последовательность, которая не встречается в природе, или имеет последовательность, которая делается искусственным объединением двух в противном случае разделенных отрезков последовательности. Данное искусственное объединение часто осуществляется химическим синтезом или, более обычно, искусственной манипуляцией с выделенными отрезками

нуклеиновых кислот, например, методиками генной инженерии, такими как методики, описанные в Green et al., выше. Данные нуклеиновые кислоты могут быть сконструированы на основе химического синтеза и/или реакций ферментативного лигирования с использованием методик, известных в данной области. См., например, Green et al., выше. Например, нуклеиновая кислота может быть синтезирована химически с использованием встречающихся в природе нуклеотидов или по-разному модифицированных нуклеотидов, сконструированных для увеличения биологической стабильности молекул или для увеличения физической стабильности дуплекса, образованного при гибридизации (например, фосфоротиоатные производные и нуклеотиды, замещенные акридином). Примеры модифицированных нуклеотидов, которые можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включают 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурidin, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N⁶-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N⁶-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N⁶-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил и 2,6-диаминопурин, но не ограничиваются ими. В качестве альтернативы, одна или более чем одна нуклеиновая кислота по изобретению может быть приобретена в компаниях, таких как Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) и Synthegen (Хьюстон, TX).

Данная нуклеиновая кислота может содержать любую выделенную или очищенную нуклеотидную последовательность, которая кодирует любую из конструкций CAR или его функциональных частей или функциональных вариантов. В качестве альтернативы, данная нуклеотидная последовательность может содержать нуклеотидную последовательность, которая является вырожденной по отношению к любым последовательностям или комбинации вырожденных последовательностей.

Согласно одному воплощению данного изобретения также предложена выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную

последовательность, которая является комплементарной нуклеотидной последовательности любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, или нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется при жестких условиях с нуклеотидной последовательностью любых нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Нуклеотидная последовательность, которая гибридизуется при жестких условиях, может гибридизоваться при очень жестких условиях. Под «очень жесткими условиями» подразумевается то, что нуклеотидная последовательность специфично гибридизуется с последовательностью-мишенью (нуклеотидная последовательность любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе) в количестве, которое является выявляемо большим, чем неспецифическая гибридизация. Очень жесткие условия включают условия, которые различали бы полинуклеотид с точной комплементарной последовательностью или полинуклеотид, содержащий только несколько рассеянных несоответствий от случайной последовательности, которая, как случилось, имеет несколько маленьких областей (например, 3-10 оснований), которые соответствуют данной нуклеотидной последовательности. Такие маленькие области комплементарности легче плавятся, чем полноразмерный комплемент из 14-17 или более оснований, и гибридизация в очень жестких условиях делает их легко различимыми. Относительно очень жесткие условия включали бы, например, условия с низкой концентрацией соли и/или высокой температурой, как, например, предоставляемые примерно 0,02-0,1 M NaCl или эквивалентом при температурах примерно 50-70°C. Такие жесткие условия допускают мало или вообще не допускают несоответствия между нуклеотидной последовательностью и матрицей или нитью-мишенью, и особенно подходят для выявления экспрессии любой из конструкций CAR по изобретению. Обычно понятно, что условия могут быть сделаны более жесткими посредством добавления возрастающих количеств формамида.

Согласно данному изобретению также предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере примерно на 70% или более, например, примерно 80%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% идентичной любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

В одном воплощении нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть включены в рекомбинантный экспрессионный вектор. В данном отношении

согласно одному воплощению изобретения предложены рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любую из нуклеиновых кислот по изобретению. Для целей данного документа термин «рекомбинантный экспрессионный вектор» означает генетически модифицированную олигонуклеотидную или полинуклеотидную конструкцию, которая обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, когда данная конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, и данный вектор приводится в контакт с клеткой при достаточных условиях для наличия экспрессии мРНК, белка, полипептида или пептида в клетке. Векторы по изобретению целиком не являются встречающимися в природе. Однако части данных векторов могут встречаться в природе. Рекомбинантные экспрессионные векторы по изобретению могут содержать любой тип нуклеотидов, включая ДНК и РНК, но не ограничиваясь ими, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, синтезированными или частично полученными из природных источников, и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды. Рекомбинантные экспрессионные векторы могут содержать встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе межнуклеотидные связи или оба типа связей. Предпочтительно не встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора. Типичный остов вектора представляет собой лентивирусный остов SEQ ID NO: 30.

В одном воплощении рекомбинантный экспрессионный вектор по изобретению может представлять собой любой подходящий рекомбинантный экспрессионный вектор, и он может использоваться для трансформации или трансфекции любой подходящей клетки-хозяина. Подходящие векторы включают векторы, сконструированные для размножения и увеличения численности или для экспрессии, или и того, и другого, как, например, плазмиды и вирусы. Вектор может быть выбран из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), серии pET (Novagen, Madison, WI), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, Palo Alto, CA). Также можно использовать бактериофаговые векторы, такие как λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149. Примеры растительных экспрессионных векторов включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). Примеры животных экспрессионных векторов включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). Рекомбинантный экспрессионный вектор

может представлять собой вирусный вектор, например, ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

В одном воплощении рекомбинантные экспрессионные векторы по изобретению могут быть получены с использованием стандартных методик генной инженерии, описанных, например, в Green et al., выше. Конструкции экспрессионных векторов, которые являются кольцевыми или линейными, могут быть получены так, чтобы они содержали функциональную систему репликации в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColEI, плазмиды 2 μ , λ , SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота и тому подобных.

Данный рекомбинантный экспрессионный вектор может содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации транскрипции и трансляции, и терминирующие кодоны, которые являются специфичными для типа клетки-хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в которую подлежит введению вектор, в зависимости от ситуации и принимая во внимание то, является ли вектор основанным на ДНК или РНК. Рекомбинантный экспрессионный вектор также может содержать сайты рестрикции для облегчения клонирования.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может включать один или более чем один маркерный ген, который обеспечивает отбор трансформированных или трансфицированных клеток-хозяев. Маркерные гены включают биоцидную устойчивость, например, устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам и т.д., комплементацию в ауксотрофном хозяине с получением прототрофии и тому подобное. Подходящие маркерные гены для экспрессионных векторов по изобретению включают, например, гены устойчивости к неомицину/G418, гены устойчивости к гигромицину, гены устойчивости к гистидинолу, гены устойчивости к тетрациклину и гены устойчивости к ампициллину.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может содержать природный или неприродный промотор, связанный функциональным образом с нуклеотидной последовательностью, кодирующей конструкцию CAR (включая ее функциональные части и функциональные варианты), или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей конструкцию CAR. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, индуцибельных, тканеспецифичных и специфичных для стадии развития, находится в пределах обычной квалификации специалиста. Аналогично, объединение нуклеотидной последовательности с промотором также находится в пределах квалификации специалиста. Данный

промотор может быть невирусным промотором или вирусным промотором, например, промотором цитомегаловируса (CMV), промотором SV40, промотором RSV (вирус саркомы Рауса) или промотором, обнаруженным в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток.

5 Рекомбинантные экспрессионные векторы по изобретению могут быть сконструированы либо для временной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обеих. Также могут быть получены рекомбинантные экспрессионные векторы для конститутивной экспрессии или для индуцибельной экспрессии.

10 Кроме того, могут быть получены рекомбинантные экспрессионные векторы, включающие суицидный ген. Термин «суицидный ген» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к гену, который вызывает гибель клетки, экспрессирующей данный суицидный ген. Суицидный ген может представлять собой ген, который придает чувствительность к агенту, например,
15 лекарственному средству, клетке, в которой экспрессируется данный ген, и вызывает гибель клетки при контакте клетки или воздействии на клетку данного агента. Суицидные гены известны в данной области и включают, например, ген тимидинкиназы (ТК) вируса простого герпеса (HSV), цитозин дезаминазу, фосфорилазу пуриновых нуклеозидов и нитроредуктазу.

20 В объем данного изобретения включаются конъюгаты, например, биоконъюгаты, содержащие любую из конструкций CAR по изобретению (включая любую из ее функциональных частей или вариантов), нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы, клетки-хозяева или популяции клеток-хозяев. Конъюгаты, а также способы синтеза конъюгатов в общем известны в
25 данной области.

 Согласно одному воплощению данного изобретения дополнительно предложена клетка-хозяин, содержащая любой из рекомбинантных экспрессионных векторов, описанных в данном документе. Термин «клетка-хозяин» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к любому
30 типу клетки, которая содержит рекомбинантный экспрессионный вектор по изобретению. Данная клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, растительную, животную, грибную клетку или клетку водоросли, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, бактерии или протиста. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или
35 первичную клетку, т.е. выделенную непосредственно из организма, например, человека. Данная клетка-хозяин может представлять собой прикрепленную клетку

или суспендированную клетку, т.е. клетку, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области и включают, например, клетки *E. coli* DH5 α , клетки яичника китайского хомяка, клетки VERO обезьяны, клетки COS, клетки HEK293 и тому подобные. В целях амплификации или репликации рекомбинантного экспрессионного вектора клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой, например, клеткой DH5 α . В целях получения рекомбинантной конструкции CAR клетка-хозяин может быть клеткой млекопитающего. Данная клетка-хозяин может быть человеческой клеткой. В то время как клетка-хозяин может быть любого типа клеток, может возникать из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития, данная клетка-хозяин может быть лимфоцитом периферической крови (PBL) или одноядерной клеткой периферической крови (PBMC). Клетка-хозяин может быть Т-клеткой или NK-клеткой (природный киллер).

В целях данного изобретения Т-клетка может представлять собой любую Т-клетку, такую как культивируемая Т-клетка, например, первичную Т-клетку или Т-клетку из линии культивируемых Т-клеток, например, Jurkat, SupT1 и т.д., или Т-клетку, полученную от млекопитающего. При получении от млекопитающего Т-клетка может быть получена из многочисленных источников, включая кровь, костный мозг, лимфатический узел, тимус или другие ткани и жидкости, но не ограничиваясь ими. Т-клетки также могут быть обогащены или очищены. Т-клетка может быть человеческой Т-клеткой. Т-клетка может быть Т-клеткой, выделенной у человека. Т-клетка может быть любым типом Т-клетки и может находиться на любой стадии развития, включая дважды позитивные Т-клетки CD4⁺/CD8⁺, хелперные Т-клетки CD4⁺, например, клетки Th₁ and Th₂, Т-клетки CD8⁺ (например, цитотоксические Т-клетки), клетки, инфильтрующие опухоль, Т-клетки памяти, наивные Т-клетки и тому подобное. Т-клетка может представлять собой Т-клетку CD8⁺ или Т-клетку CD4⁺.

Воплощением данного изобретения также предложена популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Данная популяция клеток может представлять собой гетерогенную популяцию, содержащую клетку-хозяина, содержащую любой описанный рекомбинантный экспрессионный вектор, помимо по меньшей мере одной другой клетки, например, клетки-хозяина (например, Т-клетки), которая не содержит какие-либо рекомбинантные экспрессионные векторы, или клетки, отличные от Т-клетки, например, В-клетку, макрофаг, нейтрофил, эритроцит, гепатоцит, эндотелиальную клетку, эпителиальную клетку, мышечную клетку, клетку мозга и т.д. В качестве

альтернативы, данная популяция клеток может быть по существу гомогенной популяцией, в которой данная популяция содержит главным образом клетки-хозяева (например, по существу состоящая), содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор. Данная популяция также может быть клональной популяцией клеток, в которой все клетки данной популяции представляют собой клоны одной клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный экспрессионный вектор, таким образом, что все клетки данной популяции содержат рекомбинантный экспрессионный вектор. В одном воплощении данного изобретения популяция клеток представляет собой клональную популяцию, содержащую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор, как описано в данном документе.

Конструкции CAR по изобретению (включая их функциональные части и варианты), нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева (включая их популяции), все из которых в совокупности называются ниже «материалами конструкции CAR по изобретению», могут быть выделенными и/или очищенными. Термин «выделенный» в том виде, в котором он используется в данном документе, означает удаление из его природного окружения. Термин «очищенный» или «выделенный» не требует абсолютной чистоты или выделения; скорее он подразумевается как относительный термин. Таким образом, например, очищенный (или выделенный) препарат клетки-хозяина представляет собой препарат, в котором клетка-хозяин является более чистой, чем клетки в их природном окружении в организме. Такие клетки-хозяева могут быть получены, например, стандартными методиками очистки. В некоторых воплощениях препарат клетки-хозяина очищают таким образом, что данная клетка-хозяин представляет по меньшей мере примерно 50%, например, представляет по меньшей мере примерно 70% от общего содержания клеток данного препарата. Например, чистота может составлять по меньшей мере примерно 50%, может быть больше, чем примерно 60%, примерно 70% или примерно 80%, или может составлять примерно 100%.

Материалы конструкции CAR по изобретению могут быть приготовлены в виде композиции, такой как фармацевтическая композиция. В данном отношении согласно одному воплощению изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая любой из материалов конструкции CAR по изобретению, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции по изобретению, содержащие любой из материалов конструкции CAR по изобретению, могут содержать более чем один материал

конструкции CAR по изобретению, например, конструкцию CAR и нуклеиновую кислоту или две или более чем две разные конструкции CAR. В качестве альтернативы, данная фармацевтическая композиция может содержать материал конструкции CAR по изобретению в комбинации с другими фармацевтически активными средствами или лекарственными средствами, такими как химиотерапевтические средства, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубин, доксорубин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д. В предпочтительном воплощении данная фармацевтическая композиция содержит клетку-хозяина по изобретению или ее популяцию.

По отношению к фармацевтическим композициям фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой любой из традиционно используемых носителей, и он ограничивается только физико-химическими соображениями, такими как растворимость и отсутствие реакционной способности с активным(ными) средством(вами), и путем введения. Фармацевтически приемлемые носители, описанные в данном документе, например, наполнители, адъюванты, эксципиенты и разбавители, хорошо известны специалистам в данной области и легко доступны для населения. Предпочтительным является то, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой носитель, который не имеет вредных побочных эффектов или токсичности при условиях применения.

Выбор носителя будет частично определяться конкретным материалом конструкции CAR по изобретению, а также конкретным способом, используемым для введения материала конструкции CAR по изобретению. Соответственно, существует целый ряд подходящих препаратов фармацевтической композиции по изобретению. Способы получения вводимых (например, вводимых парентерально) композиций являются известными или очевидными для специалистов в данной области и более подробно описываются, например, в *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Pharmaceutical Press; 22nd ed. (2012).

Материалы конструкции CAR по изобретению могут вводиться любым подходящим способом. Предпочтительно материалы конструкции CAR по изобретению вводятся посредством инъекции (например, подкожно, внутривенно, внутриопухолево, внутриартериально, внутримышечно, внутрикожно, внутрибрюшинно или подоболочечно). Предпочтительно материалы конструкции CAR по изобретению вводятся внутривенно. Подходящий фармацевтически приемлемый носитель для материала конструкции CAR по изобретению для инъекции может включать любой изотоничный носитель, такой как, например,

нормальный физиологический раствор (примерно 0,90% масс./об. NaCl в воде, примерно 300 мОсм/л NaCl в воде или примерно 9,0 г NaCl на литр в воде), раствор электролита NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), примерно 5% декстрозы в воде или лактат Рингера. В одном воплощении фармацевтически приемлемый носитель дополняют человеческим сывороточным альбумином.

Термин «эффективное количество» или «эффективное количество для лечения» относится к дозе, которая является адекватной для предупреждения или лечения рака у индивида. Эффективные количества для терапевтического или профилактического применения будут зависеть, например, от стадии и тяжести заболевания или расстройства, которое лечат, возраста, массы и общего состояния здоровья пациента, мнения выдающего рецепт лечащего врача. Величина дозы также будет определяться выбранным активным средством, способом введения, расписанием и частотой введения, существованием, природой и степенью любых вредных побочных эффектов, которые могут сопровождать введение конкретного активного средства, и желательным физиологическим эффектом. Специалисту в данной области будет понятно то, что разные заболевания или расстройства могли бы потребовать длительного лечения, включающего многократные введения, возможно с использованием материалов конструкции CAR по изобретению, в каждом или разных циклах введения. В качестве примера и не намереваясь ограничивать изобретение, когда материал конструкции CAR по изобретению представляет собой клетку-хозяина, типичная доза клеток-хозяев может составлять минимум один миллион клеток (1×10^6 клеток/дозу).

В целях данного изобретения количество или доза введенного материала конструкции CAR по изобретению должна быть достаточной для осуществления терапевтического или профилактического ответа у субъекта или животного в течение приемлемых временных рамок. Например, доза материала конструкции CAR по изобретению должна быть достаточной для связывания с антигеном или выявления, лечения или предупреждения рака за период от примерно 2 часов или дольше, например, от примерно 12 до примерно 24 или более часов, со времени введения. В некоторых воплощениях данный период времени мог быть даже дольше. Доза будет определяться эффективностью конкретного материала конструкции CAR по изобретению и состоянием животного (например, человека), а также массой тела животного (например, человека), подлежащего лечению.

В целях данного изобретения анализ, который включает, например, сравнение степени, в которой лизируются клетки-мишени, и/или IFN- γ , или IL-2 секретируется Т-клетками, экспрессирующими высвобожденные CAR конструкции CAR по изобретению при введении данной дозы таких Т-клеток млекопитающему, среди набора млекопитающих, из которого каждому дается отличная доза Т-клеток, мог бы использоваться для определения исходной дозы, подлежащей введению млекопитающему. Степень, в которой клетки-мишени лизируются и/или INF- γ , или IL-2 секретируется при введении определенной дозы, может анализироваться способами, известными в данной области.

При введении материалов конструкции CAR по изобретению с одним или более чем одним дополнительным терапевтическим средством одно или более чем одно дополнительное терапевтическое средство может совместно вводиться данному млекопитающему. Под «совместным введением» подразумевается введение одного или более чем одного дополнительного терапевтического средства и материалов конструкции CAR по изобретению достаточно близко по времени, таким образом, что материалы конструкции CAR по изобретению могут усиливать эффект одного или более чем одного дополнительного терапевтического средства или наоборот. В данном отношении материалы конструкции CAR по изобретению могут вводиться первыми, а одно или более чем одно дополнительное терапевтическое средство может вводиться вторым или наоборот. В качестве альтернативы, материалы конструкции CAR по изобретению и одно или более чем одно дополнительное терапевтическое средство могут вводиться одновременно. Типичное терапевтическое средство, которое может вводиться совместно с материалами конструкции CAR, представляет собой IL-2.

Рассматривается то, что материалы конструкции CAR по изобретению могут использоваться в способах лечения или предупреждения заболевания у млекопитающего. Не будучи связанными конкретной теорией или механизмом, конструкции CAR по изобретению имеют биологическую активность, например, CAR, которые распознают антиген, например, CD33, таким образом, что CAR при экспрессии клеткой способны опосредовать иммунный ответ против клетки, экспрессирующей антиген, например, CD33. В данном отношении согласно одному воплощению изобретения предложен способ лечения или предупреждения рака у млекопитающего, включающий введение данному млекопитающему любой из конструкций CAR, нуклеиновых кислот, рекомбинантных экспрессионных векторов, клеток-хозяев, популяций клеток и/или фармацевтических композиций по

изобретению в эффективном количестве для лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

Одно воплощение данного изобретения дополнительно включает лимфодеплецию млекопитающего перед введением материалов конструкции CAR по изобретению. Примеры лимфодеплеции включают немиелоаблативную лимфодеплеционную химиотерапию, миелоаблативную лимфодеплеционную химиотерапию, общее облучение организма и т.д., но могут не ограничиваться ими.

В целях способов по изобретению, где вводятся клетки-хозяева или популяции клеток, данные клетки могут представлять собой клетки, которые являются аллогенными или аутологичными по отношению к млекопитающему. Предпочтительно данные клетки являются аутологичными по отношению к млекопитающему.

Млекопитающее, на которое дается ссылка в данном документе, может быть любым млекопитающим. Термин «млекопитающее» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к любому млекопитающему, включающему млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики, но не ограничивающихся ими. Данные млекопитающие могут быть из отряда Carnivora, включающего Felines (кошки) и Canines (собаки). Данные млекопитающие могут быть из отряда Artiodactyla, включающего Bovines (коровы) и Swines (свиньи) или отряда Perssodactyla, включающего Equines (лошади). Данные млекопитающие могут быть из отряда Primates, Ceboids или Simoids (обезьяны) или порядка Anthropoids (человек и человекообразные обезьяны). Предпочтительно данное млекопитающее представляет собой человека.

В отношении способов лечения по изобретению данное раковое заболевание может представлять собой любое раковое заболевание, включающее острый лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, альвеолярную рабдомиосаркому, рак мочевого пузыря (например, карциному мочевого пузыря), рак кости, рак мозга (например, медуллобластому), рак молочной железы, рак анального отверстия, анального канала или ануса и прямой кишки, рак глаза, рак внутрипеченочного желчного протока, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, полости носа или среднего уха, рак полости рта, рак вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелоидный рак, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, фибросаркому, желудочно-кишечную карциноидную опухоль, рак головы и шеи (например, плоскоклеточную карциному головы и шеи), ходжкинскую лимфому, рак гортаноглотки, рак почки, рак

гортани, лейкоз, опухоли жидких тканей, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточную карциному легкого), лимфому, злокачественную мезотелиому, мастоцитому, меланому, множественную миелому, рак носоглотки, неходжкинскую лимфому, В-хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз
5 В-предшественников (B-ALL), острый лимфобластный лейкоз предшественников пре-B-клеток (BCP-ALL), В-клеточную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) и лимфому Беркитта, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак брюшины, сальника и мезентерия, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак кожи, рак тонкой кишки,
10 рак мягкой ткани, солидные опухоли, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы и рак мочеточника. Предпочтительно данное раковое заболевание представляет собой гематологическое злокачественное заболевание (например, лейкоз или лимфому, включая ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, CLL, острый лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, В-хронический
15 лимфоцитарный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) (также именуемый «острый лимфобластный лейкоз»), B-ALL, BCP-ALL, В-клеточную лимфому и лимфому Беркитта). Предпочтительно данное раковое заболевание характеризуется экспрессией CD33.

Термины «лечить» и «предупреждать», а также слова, образующиеся из них, в том виде, в котором они используются в данном документе, не обязательно подразумевают 100%-ное или полное лечение или предупреждение. Скорее
20 имеются разные степени лечения или предупреждения, из которых обычный специалист в данной области распознает имеющих потенциальную пользу или терапевтический эффект. В данном отношении способы по изобретению могут
25 обеспечивать любое количество любого уровня лечения или предупреждения рака у млекопитающего. Кроме того, лечение или предупреждение, обеспечиваемые способом по изобретению, может включать лечение или предупреждение одного или более чем одного состояния или симптома заболевания, например, рака, который лечится или предупреждается. Также в целях данного документа
30 «предупреждение» может охватывать отсрочку начала заболевания или его симптома, или состояния.

Согласно другому воплощению данного изобретения предложено применение конструкций CAR по изобретению, нуклеиновых кислот, рекомбинантных экспрессионных векторов, клеток-хозяев, популяций клеток или
35 фармацевтических композиций для лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

Согласно другому воплощению данного изобретения предложен способ выявления присутствия рака у млекопитающего, включающий: (а) приведение в контакт образца, содержащего одну или более чем одну клетку от млекопитающего, с конструкциями CAR, нуклеиновыми кислотами, рекомбинантными экспрессионными векторами, клетками-хозяевами, популяциями клеток или фармацевтическими композициями по изобретению, образуя, посредством этого, комплекс, (б) и выявление комплекса, где данное выявление комплекса указывает на присутствие рака у млекопитающего.

Данный образец может быть получен любым подходящим способом, например, биопсией или некропсией. Биопсия представляет собой удаление ткани и/или клеток от индивида. Такое удаление может осуществляться для сбора ткани и/или клеток от индивида для того, чтобы осуществлять эксперименты на удаленной ткани и/или клетках. Данное экспериментирование может включать эксперименты для определения того, имеет ли индивид и/или страдает ли от определенного состояния или болезненного состояния. Данное состояние или заболевание может представлять собой, например, рак.

В отношении воплощения способа по изобретению выявления присутствия рака у млекопитающего образец, содержащий клетки млекопитающего, может представлять собой образец, содержащий целые клетки, их лизаты или фракцию лизатов целых клеток, например, ядерную или цитоплазматическую фракцию, фракцию цельного белка или фракцию нуклеиновых кислот. Если образец содержит целые клетки, данные клетки могут представлять собой любые клетки млекопитающего, например, клетки любого органа или ткани, включая клетки крови или эндотелиальные клетки.

В целях способа выявления по изобретению приведение в контакт может происходить *in vitro* или *in vivo* по отношению к млекопитающему. Предпочтительно приведение в контакт осуществляется *in vitro*.

Также выявление данного комплекса может осуществляться посредством любого числа способов, известных в данной области. Например, конструкции CAR по изобретению, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы, клетки-хозяева или популяции клеток, описанные в данном документе, могут быть мечеными выявляемой меткой, такой как, например, радиоактивный изотоп, флуорофор (например, флуоресцеина изотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена) и метки элементами (например, частицы золота).

Способы проведения анализа CAR на способность распознавать клетки-мишени и на специфичность к антигену известны в данной области. Например, в Clay et al., *J. Immunol.*, 163: 507-513 (1999) изложены способы измерения высвобождения цитокинов (например, интерферона- γ , гранулоцитарного/моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) или интерлейкина 2 (IL-2)). Кроме того, функция CAR может быть выявлена измерением клеточной цитотоксичности, как описано в Zhao et al., *J. Immunol.*, 174: 4415-4423 (2005).

Следующее включает определенные аспекты данного изобретения.

- 10 1. Химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, имеющий антигенную специфичность в отношении CD33, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки, в котором:
 - (а) антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 Hu195; или
 - 15 (б) антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 Hu195, где области CDR представляют собой области SEQ ID NO: 41-46.
- 20 2. CAR по аспекту 1, в котором антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 15.
3. CAR по аспекту 1 или 2, в котором антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 16.
4. CAR по любому из аспектов 1-3, в котором антигенсвязывающий домен содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 4.
5. CAR по любому из аспектов 1-4, в котором антигенсвязывающий домен
- 25 содержит антигенсвязывающий домен SEQ ID NO: 15, 4 и 16.
6. CAR по любому из аспектов 1-5, где данный CAR содержит (i) трансмембранный домен CD8 SEQ ID NO: 7 и шарнирный домен CD8 SEQ ID NO: 6 или (ii) трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO: 11 и шарнирный домен CD28 SEQ ID NO: 10.
- 30 7. CAR по любому из аспектов 1-6, в котором внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки содержит внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки 4-1BB SEQ ID NO: 8, внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки CD3 дзета SEQ ID NO: 9 или и тот, и другой.
8. CAR по любому из аспектов 1-7, где данный CAR дополнительно
- 35 содержит спейсер.

9. Химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, имеющий антигенную специфичность в отношении CD33, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки, в котором:

5 (а) антигенсвязывающий домен содержит переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 hP67.6, и/или

(б) антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 hP67.6,

в котором области CDR представляют собой области CDR SEQ ID NO: 47-52.

10 10. CAR по аспекту 9, в котором антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 3.

11. CAR по аспекту 9 или 10, в котором антигенсвязывающий домен содержит переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 5.

15 12. CAR по любому из аспектов 9-11, в котором антигенсвязывающий домен содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 4.

13. CAR по любому из аспектов 9-12, в котором антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий домен SEQ ID NO: 3, 4 и 5.

20 14. CAR по любому из аспектов 9-13, где данный CAR содержит (i) трансмембранный домен CD8 SEQ ID NO: 7 и шарнирный домен CD8 SEQ ID NO: 6 или (ii) трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO: 11 и шарнирный домен CD28 SEQ ID NO: 10.

25 15. CAR по любому из аспектов 9-14, в котором внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки содержит внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки 4-1BB SEQ ID NO: 8, внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки CD3 дзета SEQ ID NO: 9 или и тот, и другой.

16. CAR по любому из аспектов 9-15, где данный CAR дополнительно содержит спейсер.

17. CAR, содержащий SEQ ID NO: 16 или 17, или 20, или 21.

30 18. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR по любому из аспектов 1-17.

19. Нуклеиновая кислота по аспекту 18, в которой нуклеотидная последовательность является оптимизированной по кодонам.

20. Рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по аспекту 18 или 19.

35 21. Выделенная клетка-хозяин, содержащая рекомбинантный экспрессионный вектор по аспекту 20.

22. Популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина по аспекту 21.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая CAR по любому из аспектов 1-17, нуклеиновую кислоту по аспекту 18 или 19, рекомбинантный экспрессионный вектор по аспекту 20, клетку-хозяина по аспекту 21 или популяцию клеток по аспекту 22 и фармацевтически приемлемый носитель.

24. Способ выявления присутствия рака, включающий:

(а) приведение в контакт образца, содержащего одну или более чем одну клетку, с CAR по любому из аспектов 1-17, нуклеиновой кислотой по аспекту 18 или 19, рекомбинантным экспрессионным вектором по аспекту 20, клеткой-хозяином по аспекту 21 или популяцией клеток по аспекту 22, или фармацевтической композицией по аспекту 23, образуя, посредством этого, комплекс и

(б) выявление данного комплекса, где выявление данного комплекса указывает на присутствие рака.

25. Способ по аспекту 24, где рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

26. CAR по любому из аспектов 1-17, нуклеиновая кислота по аспекту 18 или 19, рекомбинантный экспрессионный вектор по аспекту 20, клетка-хозяин по аспекту 21, популяция клеток по аспекту 22 или фармацевтическая композиция по аспекту 23 для применения в лечении или предупреждении рака у млекопитающего.

27. CAR, нуклеиновая кислота, рекомбинантный экспрессионный вектор, клетка-хозяин, популяция клеток или фармацевтическая композиция по аспекту 26, где раковое заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз.

28. Способ лечения или предупреждения рака у млекопитающего, включающий введение данному млекопитающему эффективного количества CAR по любому из аспектов 1-17, нуклеиновой кислоты по аспекту 18 или 19, рекомбинантного экспрессионного вектора по аспекту 20, клетки-хозяина по аспекту 21, популяции клеток по аспекту 22 или фармацевтической композиции по аспекту 23.

29. Способ по аспекту 29, в котором раковое заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз.

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение, но, естественно, не должны истолковываться как каким-либо способом, ограничивающие его объем.

ПРИМЕР 1

Данный пример демонстрирует применение CAR согласно воплощениям данного изобретения.

5

Конструкции CAR

Разрабатывали конструкции CAR с последовательностями одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), специфичного в отношении мишени, связанного с трансмембранными доменами, и образующими пары либо с костимулирующим доменом 4-1BB, либо CD28, доменами сигнализации CD3 дзета, и клонировали их в лентивирусную плазмиду третьего поколения. scFv против CD33 конструкций CAR получали из следующих: линтузумаб (Hu195, SGN-33) (Co et al., J. Immunol., 148: 1149-54 (1992)) и CD33Mylo (гемтузумаб озогамицин, торговое наименование: милотарг, компания: Wyeth, гуманизированное mAb (моноклональное антитело)/калихеамицин, CD33; патент США № 5739116; Cowan et al., Front Biosci (Landmark Ed.), 18: 1311-34 (2013)). CAR CD123 получали из 32716-scFv (международная патентная заявка с № публикации WO 2014/144622). Данные CAR субклонировали в остов лентивирусного вектора pELNS. Все рестрикционные ферменты приобретали у New England Biolabs (Ipswich, MA, США). Последовательности всех конструкций CAR были подтверждены секвенированием в Macrogen (Rockville, MD, США). См. Фиг. 1А и 1Б.

10
15
20

Линии клеток

Экспрессирующие GFP (зеленый флуоресцентный белок) и люциферазу линии клеток AML MV411, THP1 и MOLM14 содержат варьирующие уровни экспрессии CD33, и разные генотипы в отношении сплайсированных вариантов экзона 2 (Laszlo et al., Oncotarget, 7: 43281-94 (2016)), и они были использованы для анализа эффективности CAR. Посредством выделения ДНК обнаружили, что MOLM14 имеет генотип CC и не содержит SNP (однонуклеотидный полиморфизм), тогда как и THP1, и MV411 являются гетерозиготными в отношении SNP с генотипом CT (Lamba et al., J. Clin. Oncol., 35: 2674-82 (2017)). Данная линия клеток не экспрессирует ни CD33, ни CD123. MV411 представляет собой линию острого моноцитарного лейкоза, полученную от 10-летнего мальчика с острым моноцитарным лейкозом (AML FAB M5). MOLM14 представляет собой линию острого миелоидного лейкоза, полученную из периферической крови 20-летнего мужчины с острым миелоидным лейкозом AML FAB M5a в момент рецидива в 1995

25
30
35

г. после исходного миелодиспластического синдрома (MDS, не поддающаяся лечению анемия с избытком бластов, RAEB). THP-1 представляет собой человеческую моноцитарную линию клеток, полученную от пациента с острым моноцитарным лейкозом. K562 представляет собой линию человеческого эритролейкоза, основанную и полученную от 53-летней пациентки с хроническим миелогенным лейкозом.

Получение Т-клеток с CAR

Лентивирусные векторы, кодирующие CAR CD33 или CD123, получали посредством временной трансфекции пакующей линии клеток лентивируса Lenti-X 293T. Клетки Lenti-X 293T высаживали на 15-см чашки, покрытые поли-D лизином (BD Biosciences, San Jose, CA, США). На следующие сутки клетки Lenti-X 293T трансфицировали с использованием липофектамина 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) плазмидами, кодирующими CAR, наряду с пакующими векторами и векторами оболочки (pMDLg/pRRE, pMD-2G и pRSV-Rev). Лентивирусные супернатанты отбирали в 24 и 48 часов после трансфекции, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 минут для удаления обломков клеток, замораживали на сухом льду и хранили при -80°C. Человеческие PBMC (однойдерные клетки периферической крови) получали с использованием протокола, одобренного NIH (Национальные институты здоровья США), и активировали с использованием соотношения 1:3 микрошариков CD3/CD28 (Dynabeads Human T-Expander CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific, кат. № 11141D) в среде AIM-V, содержащей 40 IU (международные единицы)/мл рекомбинантного IL-2 и 5% FBS (фетальная телячья сыворотка) в течение 24 часов. Активированные Т-клетки ресуспендировали в концентрации 2 миллиона клеток на 2 мл лентивирусного супернатанта плюс 1 мл свежей среды AIM-V с 10 мкг/мл протамина сульфата и 100 IU/мл IL-2 в 6-луночных планшетах. Планшеты центрифугировали при 1000 g в течение 2 часов при 32°C и инкубировали в течение ночи при 37°C. Вторую трансдукцию осуществляли на следующие сутки посредством повторения такой же методики трансдукции, которая была описана выше. Шарик CD3/CD28 удаляли на третьи сутки после трансдукции, и клетки культивировали в концентрации 300000 клеток/мл в AIM-V, содержащей 100 IU/мл IL2, причем свежую среду, содержащую IL2, добавляли каждые 2-3 суток до отбора в сутки 8 или 9.

Проточная цитометрия

Поверхностную экспрессию Т-клеток, трансдуцированных CAR CD33, определяли посредством проточной цитометрии с использованием либо белка-L (Thermo Fisher), либо биотинилированного человеческого Siglec-3 / белка CD33 (Acro Biosystems, Newark, DE, США), с последующей инкубацией со стрептавидином-PE (BioLegend, San Diego, CA, США). Экспрессию CAR CD123 выявляли с использованием белка-L. Экспрессию CD33, CD123 и других маркеров клеточной поверхности выявляли с использованием следующих антител от eBioscience (Thermo Fisher): против CD33, CD45, CD3, CD8a, CD4, CD10.

10

PDX

1 миллион лейкозных клеток PDX JMM117 инъецировали мышам NSG за одну неделю до адоптивного переноса Т-клеток с CAR. Данных мышей обрабатывали Т-клетками с CAR в сутки 0. Через две недели данных мышей забивали, и проводили анализ на лейкозные клетки и Т-клетки с CAR.

15

Анализ цитотоксичности

5E4 опухолевых клеток-мишеней в 100 мкл среды RPMI загружали в 96-луночный планшет (Corning® (Corning, NY) BioCoat™ поли-L-лизиновый 96-луночный планшет для анализа с прозрачным плоским дном, обработанный TC). Равное количество Т-клеток с CAR загружали в предназначенную для этого лунку на следующие сутки. Исходный инкубитный маркер апоптоза (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, США) разводили в 100 мл PBS, и добавляли в каждую лунку 1 мкл разбавителя. Данный планшет сканировали на экспрессию флуоресцентной метки GFP и/или RFP (красный флуоресцентный белок) для отслеживания апоптоза клеток с использованием системы IncuCyte ZOOM® каждые 30 минут на протяжении 40 часов. Процентную долю умерщвления клеток в каждый момент времени корректировали на исходный уровень.

20

25

30

Анализ продукции цитокинов

Опухолевую клетку-мишень и трансдуцированные Т-клетки, позитивные в отношении CAR, 3 раза промывали 1× PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) и ресуспендировали в RPMI в концентрации 1E6/мл. 100 мкл опухолевых клеток со 100 мкл Т-клеток, позитивных в отношении CAR, загружали в каждую лунку 96-луночного планшета. Были установлены контроли в виде только Т-клеток и только опухолевых клеток. Все анализы проводили в двойной или в тройной повторности.

35

Клетки инкубировали в течение 18 часов при 37°C, и 120 мкл супернатанта культуры отбирали для выявления продукции цитокинов. Уровни цитокинов в супернатантах измеряли с использованием либо наборов ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) (R&D Systems, Minneapolis, MN, США), либо мультиплексного анализа (Meso Scale Discovery, Rockville, MD, США).

Биоэнергетические анализы

Для стрессового анализа гликолиза Т-клетки с CAR суспендировали в бессывороточной небуферизованной среде DMEM (среда Игла, модифицированная по Дульбекко) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США), дополненной L-глутамином (200 мМ) и NaCl (143 мМ). Добавляли 0,6 мл 0,5%-ного раствора фенольного красного (Sigma P0290) для получения конечной концентрации 3 мг/л и доводили до pH 7,35 +/- 0,05. Т-клетки с CAR высаживали на планшеты для клеток Seahorse (3E5 клеток на лунку), покрытые Cell-Tak (Corning), для облегчения прикрепления Т-клеток. Вкратце, картриджи гидратировали за сутки до анализа. В сутки анализа планшеты покрывали Cell-Tak, и клетки высевали в планшеты, покрытые Cell-Tak, и помещали на анализатор XF24 для анализа. Подробная методика является следующей. Картридж для анализа исходно гидратировали калибровочным раствором XF в объеме 200 мкл/лунку, добавляли гидробустер, заворачивали в парафильм, и сенсорный картридж помещали на плитку и инкубировали при 37°C без CO₂ в течение ночи. Планшет для культуры затем покрывали Cell-Tak следующим образом: для 1 планшета 46 мкл Cell-Tak разводили в 204 мкл воды TC и 1 мл NaHCO₃. С использованием миксера в каждую лунку распределяли 50 мкл, и данный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 20 минут. После удаления раствора Cell-Tak использовали 250 мкл воды TC для промывки каждой лунки. Т-клетки с CAR (3E5/лунку) высаживали в 158 мкл среды для анализа. Планшет для культуры клеток затем центрифугировали при 450 об./мин в течение 1 с при медленном ускорении и без замедления, и затем обращали ориентацию данного планшета, и центрифугировали при 650 об./мин в течение 1 с при медленном ускорении и без замедления. Данный планшет затем инкубировали при 37°C, 0% CO₂ в течение 25-30 минут. После 25-30 минут инкубации на верх каждой лунки вдоль стороны стенки медленно и аккуратно добавляли 158 мкл теплой среды для анализа с использованием ручной пипетки P200. Планшеты для клеток инкубировали в течение 15-25 минут. Через 15-25 минут данные планшеты

помещали на анализатор XF24 (после завершения калибровки). Осуществляли анализ XF. Раствор последовательно инъецировали через три порта: порт А: 80 мМ глюкоза (96 мкл маточного раствора в 3 мл среды для анализа). Порт Б: 18 мкМ олигомицин (10,8 мкл маточного раствора в 3 мл среды для анализа). Порт В: 2DG применяемого маточного раствора. Стрессовый анализ гликолиза проводили посредством измерения ECAR (скорость закисления внеклеточной среды) (мрН/мин) в стационарном состоянии после загрузки портов картриджа 75 мкл раствора лекарственного средства. Для митохондриального стрессового анализа Т-клетки с CAR суспендировали в бессывороточной небуферизованной среде DMEM с D-глюкозой (25 мМ) и пируватом натрия (1 мМ). Митохондриальный стрессовый анализ проводили аналогично описанному выше посредством измерения OCR (скорость потребления кислорода) (пмоль/мин) в стационарном состоянии и после последовательной инъекции олигомицина (0,5 мкМ), FCCP (0,5 мкМ), ротенона (1 мкМ) и антимицина А (1 мкМ) (Sigma-Aldrich). В экспериментах с системой Seahorse использовали следующие условия анализа: 2 минуты смешивания; 2 минуты ожидания; и 3 минуты измерения. Все образцы анализировали в шести повторностях.

Визуализация и анализ посредством флуоресцентной микроскопии

Опухолевые клетки MOLM14 (4×10^5) высаживали в 1 мл теплой RPMI на покрытую Cell-tak внутреннюю стенку 35 мм ibidi μ -Dish и инкубировали в течение ночи в инкубаторе при 37°C. Опухолевые клетки затем окрашивали красителем Хёхста (2,5 мкг/мл). Т-клетки трансдуцировали для экспрессии слитых белков CAR-mCherry. CAR-позитивные Т-клетки сортировали, и затем $7,5 \times 10^5$ данных CAR-Т-клеток инкубировали с фиксированной клеткой MOLM14 в планшете в течение часа. Клетки затем промывали и фиксировали свежеприготовленным 4%-ным параформальдегидом, и заделывали в неотверждаемой заливочной среде в препарате для визуализации.

Для оценки экспрессии актина на иммунном синапсе вышеописанный протокол модифицировали, и образцы пермеабелизировали 0,1%-ным Triton X после параформальдегидной фиксации. Клетки окрашивали фаллоидином 640 (165 нМ) и затем промывали перед заливкой.

Изображения Airyscan получали с использованием Zeiss LSM 880. Установка экспозиции была одинаковой для всего эксперимента. Изображения получали в виде z-стопки для покрытия всего объема иммунного синапса.

Некоторые изображения получали с использованием конфокального микроскопа с вращающимся диском Nikon Eclipse Ti2 с объективом 63×. Z-стопки толщиной 0,5 мкм получали параллельно в интервале 10 мкм над и под фокальной плоскостью для трех каналов (405, 488, 640 нм). Каждый канал возбуждали при 50%-ной интенсивности лазера со временем экспозиции 300 мс, 1 с и 300 мс для 405, 488 и 640 соответственно. Для анализа данных использовали программу ImageJ.

Агрегацию CAR в иммунном синапсе (IS) наблюдали для обеих конструкций CD33-28 и CD33-BBz CAR. Повышенное накопление F-актина коррелятивно наблюдали в IS относительно незанятых клеток для обеих конструкций CAR. Количественный анализ для n больше 10 иммунных синапсов для каждого CAR проводили для оценки накопления CAR и актина. В частности, определяли отношение средней интенсивности флуоресценции (MFI) в синапсе относительно MFI на остальной поверхности T-клетки. Дополнительные параметры включают отношение MFI*объем на IS относительно MFI*объем для остальной поверхности T-клетки, MFI*объем IS относительно MFI*объем T-клетки, также оценивали внутриклеточный сигнал CAR относительно внеклеточного сигнала CAR. Для актина интенсивность флуоресценции на IS нормировали относительно исходной экспрессии актина T-клетки. Определяли MFI*объем актина в IS, и MFI*объем незанятых T- и опухолевых клеток вычитали для учета исходной экспрессии актина.

Последовательность mCherry представляет собой:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATG
CGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGG
25 GCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGA
CCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTAC
GGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGT
CCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGT
GGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTG
30 AAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCA
TGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG
GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGT
CAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTC
AACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTA
35 CGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
(SEQ ID NO: 40)

Эксперименты *in vivo*

Эксперименты на животных проводили согласно протоколам, одобренным Комитетом по уходу и использованию животных NCI Bethesda. Мышам NSG в.в. (внутривенно) инъецировали линии клеток AML и ксенотрансплантированные образцы человеческого AML. Для линий, экспрессирующих люциферзу, лейкоз выявляли с использованием Xenogen IVIS Lumina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, США). NSG внутрибрюшинно инъецировали 3 мг D-люциферина (Caliper Life Sciences) и визуализировали через 4 минуты со временем экспозиции 1 мин для линий клеток AML. Для анализа общего потока биолюминисцентного сигнала для каждой мыши в виде фотонов/с использовали программу Living Image в версии 4.1 (Caliper Life Sciences). Во время умерщвления костный мозг, селезенку и печень мышей отбирали и оценивали проточной цитометрией.

15 Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы Prism 7.0. Графики представлены в виде среднего плюс/минус SD (стандартное отклонение). Статистическую значимость всех данных рассчитывали с использованием непарного t-критерия Стьюдента. P меньше 0,05 считали значимым.

20

Разработка CAR CD33 и CD123

Второе поколение CAR разрабатывали с использованием двух scFv, объединенных либо с костимулирующим доменом 4-1BB, либо с костимулирующим доменом CD28. Для CAR против CD33 CAR CD33.1 содержит антитело гемтузумаб, которое также известно как Mylotarg; CAR CD33.2 содержит антитело, известное как линтузумаб, или гуманизированное M195 (Hu195). CAR против CD123 был получен из 32716 – мышинового моноклонального антитела, которое специфично связывается с человеческим CD123. После трансдукции выявление с белком L показало то, что CAR с одинаковым scFv имеют аналогичный уровень эффективности трансдукции, независимо от костимулирующего домена. Различия в эффективности трансдукции, по-видимому, связаны с scFv. У CAR CD123 эффективность трансдукции выше; однако, плотность экспрессии CAR на поверхности выглядит ниже, чем, в общем, у CAR CD33. См. Фиг. 2A-2F.

30

Оценка поверхностной экспрессии CD33 и CD123 на AML

Четыре линии клеток K562, MV411, MOLM14 и THP1 оценивали с использованием проточных антител против CD33 на поверхностную экспрессию CD33. MV411, MOLM14 и THP1 экспрессируют CD33 в возрастающем порядке 5 повышенной поверхностной экспрессии CD33. Для поверхностной экспрессии CD123 имеется повышенная поверхностная экспрессия в порядке K562, THP1, MOLM14 и MV411. Данные три линии клеток AML демонстрируют широкий интервал поверхностной экспрессии и, таким образом, были выбраны для дальнейших экспериментов. См. Фиг. 3А и 3В.

10

Анализы продукции и цитотоксичности цитокинов *in vitro* подтверждают активность CAR против опухолей-мишеней

Анализы цитокинов *in vitro* использовали для оценки эффективности CAR против AML. В общем, продукция цитокинов коррелировала с уровнем экспрессии антигена-мишени и выявляла то, что CAR, оснащенные CD28, систематически продуцировали больше интерферона-гамма, чем CAR, оснащенные 4-1BB, среди многих линий клеток AML. CAR CD33.2 и CD123 создавали меньше IFN-гамма, чем CAR CD33.1 в общем. Примечательно то, что CAR CD33.1 BBz и CD28z, и CD33.2 BBz имели некоторую активность с продукцией IFN-гамма без стимуляции 20 опухолевым антигеном, тогда как CAR CD33.28z не имели выявляемого уровня IFN-гамма.

IL-2 считали более надежным маркером эффективности CAR. CD33.1-28z и CD33.1-BBz продуцируют высокое количество только IL-2 при инкубации с линией клеток THP1 с высокой экспрессией антигена CD33. В отличие от этого, CAR CD33.2-28z создавал сравнительный уровень IL-2 с линией THP1 и достаточное количество IL-2 против MOLM14, которая имеет умеренный уровень экспрессии антигена-мишени. CAR CD123 также создают достаточное количество IL-2 против MOLM14 и THP1, но не создают выявляемого уровня IL-2 с MV411. Оба CAR CD33.1 и CD33.2 продуцировали низкий уровень IL-2 против MV411, указывая на 30 то, что низкая активность *in vivo* может быть обусловлена низкой поверхностной экспрессией антигена, также свидетельствуя о том, что может быть низкая активность *in vivo*. См. Фиг. 4А-4F.

В анализе умерщвления IncuCyte Т-клетки, трансдуцированные CAR CD33, инкубировали с лейкозными клетками-мишенями. Процентную долю живой 35 лейкозной клетки относительно исходной высаженной клетки откладывали на

графике. Данные графики продемонстрировали эффективное умерщвление лейкоза THP1, MV411 и MOLM14 *in vitro*. См. Фиг. 5A-5E.

CAR 28z является более эффективным, чем CAR 4-1BB на модели AML, а CAR BBz демонстрируют картины экстремедуллярных рецидивов заболевания.

5 Для переноса этих данных в условия *in vivo* в моделях ксенотрансплантатов инъецировали клетки AML THP1 и обрабатывали одними из Т-клеток с CAR CD33. Посредством билюминисцентной визуализации CAR CD33.1 демонстрировали больше токсичности, чем CAR CD33.2, что видно по уменьшению массы, гипотермии и заторможенности. У мышей, обработанных CD33.2-CD28z не было
10 выявляемого заболевания, тогда как мыши, обработанные CD33-4-1 BB имели лейкоз, что указывает на то, что CAR, оснащенный 28z, является более эффективным, чем CAR 4-1BB в искоренении AML. Это отличается от наблюдения в модели ALL. Данное явление дополнительно подтверждали с CAR CD123 на модели THP1, CAR CD33.1 на модели MOLM14.

15 Результаты *in vitro* и *in vivo* в совокупности свидетельствуют о том, что костимулирующий домен не играет критически важной роли в функциональности Т-клеток с CAR и может иметь разное влияние в разных опухолевых моделях. Для подтверждения присутствия AML у мышей, выявленного по билюминисценции, проводили проточную цитометрию на тканях мышей. Животные, обработанные
20 CD33-4-1BB, были чистыми от какого-либо лейкоза в костном мозге, свидетельствуя о присутствии экстремедуллярного заболевания (EMD). Развитие EMD у мышей, обработанных менее мощным CAR CD33-4-1BB свидетельствует о том, что иммунное давление CAR может быть достаточно сильным для очистки первичных сайтов лейкоза, таких как костный мозг, но не способно устранять
25 заболевание во вторичных тканях, которые может засевать AML.

Для дальнейшего исследования влияния этих двух костимулирующих факторов использовали другую модель AML – MV411 – в которой регулярно представлено EMD даже в отсутствие давления CAR. С использованием CD33.2-CD28 против MV411 имелся клиренс в костном мозге, однако CAR CD33.2-CD28 не
30 был способен предупреждать развитие EMD. Данные эксперименты свидетельствуют о том, что хотя костимулирующий домен CD28 и является более мощным, чем 4-1BB в THP1, эффективность CD28 все же не способна преодолеть EMD во всех моделях.

В модели MOLM14, при отборе тканей для просмотра фенотипа лейкоза и Т-клеток с CAR у мышей, использовали проточную цитометрию для анализа данных
35 типов клеток. У мышей, обработанных CAR GFP, лейкоз CD33⁺ и

трансдуцированные Т-клетки обнаруживали в компартментах костного мозга и селезенки. При условиях обработки CAR CD33.1 BBz имелись малые количества лейкоза CD33⁺, обнаруженного в костном мозге и селезенке, и большие количества в солидных опухолях, обнаруженных на ноге и окружающих кишечник. Проточный анализ опухолевых клеток показывает то, что AML все еще сохраняет поверхностную экспрессию CD33 со сдвигом к пониженному количеству экспрессии CD33.

Для подтверждения эффективности CAR CD33.2 осуществляли титрование дозы на модели агрессивной опухоли MOLM14. CAR CD33.2-28z может эффективно устранять лейкоз с использованием всего лишь 5 миллионов Т-клеток CAR⁺.

См. Фиг. 6A-6E.

Мощная активность CAR CD33.2-CD28z в отношении устранения PDX

Для подтверждения активности CAR CD33 использовали PDX - клинически релевантную модель детского AML. Один миллион лейкозных клеток JMM117 PDX инъецировали в сутки -7 мышам NSG, с последующей ADT 1E6 Т-клеток с CAR в сутки 0. CAR CD28 были лучше, чем CAR BBz, и CD33.2-BBz работает лучше, чем CAR CD33.1-BBz *in vivo* (Фиг. 7A). Это подтверждали проточным анализом в неделю 2, что селезенка мышей, обработанных CD33.1, имела выявляемые уровни лейкоза, при уровне, близком к отсутствию, с группам CAR CD33.2 (Фиг. 7B). Кроме того, данная модель PDX показала то, что CAR с костимулирующим доменом 41-BBz остается на повышенном уровне дольше (Фиг. 7C). Рассматривая персистенцию CAR, наблюдали, что среди обеих CAR CD33.1 и CD33.2 версии 4-1BBz оставались выявляемыми в значительно больших количествах, чем CAR CD28z, что может быть связано с высокой токсичностью CAR BBz в модели AML.

CAR, содержащие CD28z, демонстрируют повышенную эффективность по сравнению с CAR 4-1BB, но без повышенной токсичности. Хотя длительная В-клеточная аплазия и может быть приемлемым результатом после терапии Т-клетками с CAR CD19, принимая во внимание озабоченность относительно длительной миелосуппрессии и стойкой аплазии после подхода с Т-клетками с CAR, направленными на миелоид, менее стойкие CAR на основе CD28z могут иметь дополнительное преимущество в не только более эффективном устранении заболевания, но затем и в обеспечении нормального гематопозитического восстановления с самоограничивающейся персистенцией CAR. Стратегии по истощению CAR CD123 или рассмотрению трансплантации гематопозитических

стволовых клеток (HSCT) после CAR, направленных на AML, представляют другие стратегии для эффективного устранения стойкого CAR и восстановления эффективного гематопозза.

5 На основе вышеописанного CAR CD33.2-CD28z представляет собой самый эффективный CAR с меньшей токсичностью по сравнению со всеми другими конструкциями. Влияние данного костимулирующего домена на CAR против CD33 является противоположным от наблюдения в отношении CAR против CD19 или против CD22.

10

ПРИМЕР 2

В данном примере продемонстрирован анализ проточной цитометрией экспрессии антигена-мишени CD33 на лейкозных клетках.

15

20

25

См. Фиг. 8: U937 представляет собой линию гистиоцитарной лимфомы миелоидной линии, выделенную из гистиоцитарной лимфомы 37-летнего пациента-мужчины. THP1 представляет собой линию человеческого острого моноцитарного лейкоза, культивируемую из крови 1-летнего мальчика с острым моноцитарным лейкозом. NALM6 представляет собой линию лейкоза человеческих В-клеток-предшественников, полученную из периферической крови 19-летнего мужчины с острым лимфобластным лейкозом. MV411 представляет собой линию острого моноцитарного лейкоза, полученную от 10-летнего мальчика с острым моноцитарным лейкозом (AML FAB M5). MOLM14 представляет собой линию острого миелоидного лейкоза, полученную из периферической крови 20-летнего мужчины с острым миелоидным лейкозом – AML FAB M5a в момент рецидива в 1995 г. после исходного миелодиспластического синдрома (MDS, не поддающаяся лечению анемия с избытком бластов – RAEB); несет внутреннюю tandemную дупликацию FLT3; клеточная линия несет мутацию CBL дельта Экзон 8.

30

ПРИМЕР 3

Данный пример демонстрирует применение CAR согласно воплощениям данного изобретения.

35

Осуществление анализа *in vitro* данных конструкций выявило то, что CAR CD28 против CD33 согласованно продуцировали больше IL-2 и интерферона-гамма, чем CAR 4-1BB против CD33 среди многих линий клеток AML. Фиг. 9A и 9B представляют результаты для CAR CD33Hu195-CD28Z.

Для перевода этих данных в условия *in vivo* ксенотрансплантатным моделям (мыши: NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ партия № 005557) инъецировали клетки AML MOLM14 и обрабатывали либо Т-клетками с CAR CD28 против CD33, либо с CAR 4-1BB против CD33. Посредством биолюминисцентной визуализации мыши, обработанные CAR CD28 против CD33 не имели выявляемого заболевания, тогда как мыши, обработанные CAR 4-1BB против CD33 демонстрировали лейкоз. См. Фиг. 10.

В совокупности результаты *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о том, что костимулирующий домен не играет роли в функциональности Т-клетки с CAR и может улучшать эффективность CAR.

Для подтверждения присутствия AML у мышей, выявленного биолюминисценцией, проводили проточную цитометрию на тканях от мышей с имитирующей обработкой и обработанных CAR 4-1BB против CD33. Лейкоза не обнаруживали в костном мозге мышей, обработанных имитирующей Т-клеткой. В отличие от этого, животные, обработанные CAR 4-1BB против CD33 были чистыми в отношении какого-либо лейкоза в костном мозге, свидетельствуя о присутствии экстремедуллярного заболевания (EMD). Развитие EMD у мышей, обработанных менее мощным CAR 4-1BB против CD33, свидетельствует о том, что иммунное давление CAR может быть достаточно мощным для очистки первичных сайтов лейкоза, таких как костный мозг, но не способно устранять заболевание во вторичных тканях, которые может засевать AML. Лечение AML с использованием химиотерапии часто приводит к развитию экстремедуллярного заболевания в виде хлором.

В другой модели AML – THP1 – регулярно присутствует EMD даже в отсутствие давления CAR. С использованием CAR CD28 против CD33 против THP1 имелся клиренс в компартментах костного мозга, однако CAR CD28 против CD33 не был способен предупреждать развитие EMD. Данные эксперименты свидетельствуют о том, что хотя костимулирующий домен CD28 и является более эффективным, чем 4-1BB в MOLM14, эффективность CD28 все же не способна преодолеть EMD во всех моделях.

ПРИМЕР 4

В данном примере продемонстрировано применение CAR согласно воплощениям данного изобретения.

На Фиг. 11-12 представлены дополнительные данные.

Фиг. 11A: связывание биотинилированного Siglec-3 подтвердило функцию CAR CD33.2 *in vitro*.

Фиг. 11B: подтверждение мощной активности CD33.2-28Z в разных условиях продукции лентивирусов.

5 Фиг. 12A-C: CD33-C28z демонстрировал более сильное митохондриальное дыхание с большим запасом дыхательной способности и лучшей скоростью потребления кислорода, связанного с продукцией АТФ.

Фиг. 12D-F: неожиданно, CD33-28z также имеет усиленный гликолитический метаболизм с большей скоростью внеклеточного подкисления.

10 Для выявления CAR CD33 с использованием биотинилированного человеческого Siglec-3 / белка CD33: выявление CAR с использованием: добавить 2 мкл биотинилированного человеческого Siglec-3 / белка CD33, [Avi Tag (Avitag™) Acro Biosystems, Newark, DE, США], инкубировать в течение 20 мин, промыть один раз и инкубировать с 0,5 мкл стрептавидин-PE, инкубировать в течение еще 10
15 мин, промыть один раз, подвергнуть анализу FACS (флуоресцентная сортировка клеток).

Анализ главных компонент данных РНКсек продемонстрировал разные профили экспрессии генов, ассоциированные с CAR CD33.2-28z и CD33.2-BBz в 6 часов или 24 часа после совместной инкубации с равным числом клеток-мишеней
20 MOLM14.

CD33.2-28z не продемонстрировал или продемонстрировал минимальную токсичность вне сайта опухоли. 1E5 Т-клеток CAR⁺ совместно инкубировали с равным числом разных линий клеток iPS, представляющих нормальные ткани. Уровень IFN- γ в супернатанте культуры выявляли с использованием набора для
25 IFN- γ от R&D.

ПРИМЕР 5

30 Данный пример демонстрирует применение CAR согласно воплощениям данного изобретения.

NALM6 использовали в качестве опухолевой модели, не экспрессирующей CD33, и сравнивали с моделью MOLM14. Обработку проводили с использованием CAR CD33.2-28z. В модели NALM6 опухоль продолжала прогрессирование, тогда как в модели MOLM14 имелась пониженная опухолевая нагрузка через 3 суток
35 после обработки CAR. См. Фиг. 13.

Все ссылки, включающие публикации, патентные заявки и патенты, процитированные в данном документе, являются тем самым включенными посредством ссылки в той же самой степени, как если бы каждая ссылка была бы индивидуально и конкретно указана как включенная посредством ссылки и была бы изложена в данном документе во всей ее полноте.

Применение терминов в единственном числе и «по меньшей мере один» и аналогичных объектов ссылки в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее и единственное, и множественное число, если в данном документе не указано иное, или это явно не противоречит контексту. Применение термина «по меньшей мере один», с последующим списком из одного или более чем одного объекта (например, «по меньшей мере один из А и В») следует истолковывать как означающее один объект, выбранный из перечисленных объектов (А или В), или любую комбинацию двух или более чем двух из перечисленных объектов (А и В), если в данном документе не указано иное, или это явно не противоречит контексту. Термины «содержащий», «имеющий», «включающий» и «содержащий» следует истолковывать как открытые термины (т.е. означающие «включающий, но не ограничивающийся»), если не отмечено иное. Перечисление в данном документе интервалов значений просто предназначено для того, чтобы служить в качестве сокращенного способа индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в пределы данного интервала, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включается в описание изобретения как если бы оно было индивидуально перечислено в данном документе. Все способы, описанные в данном документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное, или это, в противном случае, явно не противоречит контексту. Применение любого и всех примеров или типичной формулировки (например, «такой как»), предложенной в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения данного изобретения и не накладывает ограничения на объем данного изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в описании изобретения не должна истолковываться как указывающая на незаявленный элемент в качестве существенного для воплощения данного изобретения на практике.

Предпочтительные воплощения данного изобретения описываются в данном документе, включая лучший способ реализации изобретения, известный авторам данного изобретения. Вариации данных предпочтительных воплощений могут стать очевидными для обычных специалистов в данной области при

прочтении вышеизложенного описания. Авторы данного изобретения ожидают, что специалисты будут применять такие вариации сообразно обстоятельствам, и авторы данного изобретения предполагают, что изобретение будет воплощаться на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, 5 данное изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета, перечисленного в формуле изобретения, приложенной к данному документу, как разрешается применимым законом. Кроме того, данным изобретением охватывается любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных ее вариациях, если в данном документе не указано иное, или это, в противном 10 случае, явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, имеющий антигенную специфичность в отношении CD33, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки, в котором
- 5 (а) антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 Hu195; или
- (б) антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 Hu195,
- 10 где области CDR представляют собой области SEQ ID NO: 41-46.
2. CAR по п. 1, в котором антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 15.
3. CAR по п. 1 или 2, в котором антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 16.
- 15 4. CAR по любому из пп. 1-3, в котором антигенсвязывающий домен содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 4.
5. CAR по любому из пп. 1-4, в котором антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий домен SEQ ID NO: 15, 4 и 16.
6. CAR по любому из пп. 1-5, где данный CAR содержит (i)
- 20 трансмембранный домен CD8 SEQ ID NO: 7 и шарнирный домен CD8 SEQ ID NO: 6 или (ii) трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO: 11 и шарнирный домен CD28 SEQ ID NO: 10.
7. CAR по любому из пп. 1-6, в котором внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки содержит внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки 4-1BB SEQ ID NO: 8, внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки CD3 дзета SEQ ID NO: 9 или и тот, и другой.
- 25 8. CAR по любому из пп. 1-7, где данный CAR дополнительно содержит спейсер.
9. Химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, имеющий антигенную специфичность в отношении CD33, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки, в котором
- 30 (а) антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 hP67.6; и/или
- (б) антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 hP67.6,
- 35 где области CDR представляют собой области SEQ ID NO: 47-52.

10. CAR по п. 9, в котором антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 3.

11. CAR по п. 9 или 10, в котором антигенсвязывающий домен содержит переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 5.

5 12. CAR по любому из пп. 9-11, в котором антигенсвязывающий домен содержит линкерную последовательность SEQ ID NO: 4.

13. CAR по любому из пп. 9-12, в котором антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий домен SEQ ID NO: 3, 4 и 5.

10 14. CAR по любому из пп. 9-13, где данный CAR содержит (i) трансмембранный домен CD8 SEQ ID NO: 7 и шарнирный домен CD8 SEQ ID NO: 6 или (ii) трансмембранный домен CD28 SEQ ID NO: 11 и шарнирный домен CD28 SEQ ID NO: 10.

15 15. CAR по любому из пп. 9-14, в котором внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки содержит внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки 4-1BB SEQ ID NO: 8, внутриклеточный домен сигнализации Т-клетки CD3 дзета SEQ ID NO: 9 или и тот, и другой.

16. CAR по любому из пп. 9-15, где данный CAR дополнительно содержит спейсер.

17. CAR, содержащий SEQ ID NO: 16 или 17, или 20, или 21.

20 18. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR по любому из пп. 1-17.

19. Нуклеиновая кислота по п. 18, в которой нуклеотидная последовательность является оптимизированной по кодонам.

25 20. Рекombинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 18 или 19.

21. Выделенная клетка-хозяин, содержащая рекombинантный экспрессионный вектор по п. 20.

22. Популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина по п. 21.

30 23. Фармацевтическая композиция, содержащая CAR по любому из пп. 1-17, нуклеиновую кислоту по п. 18 или 19, рекombинантный экспрессионный вектор по п. 20, клетку-хозяина по п. 21 или популяцию клеток по п. 22 и фармацевтически приемлемый носитель.

24. Способ выявления присутствия рака, включающий:

35 (а) приведение в контакт образца, содержащего одну или более чем одну клетку, с CAR по любому из пп. 1-17, нуклеиновой кислотой по п. 18 или 19,

рекомбинантным экспрессионным вектором по п. 20, клеткой-хозяином по п. 21 или популяцией клеток по п. 22, или фармацевтической композицией по п. 23, образуя, посредством этого, комплекс, и

5 (б) выявление данного комплекса, где выявление данного комплекса указывает на присутствие рака.

25. Способ по п. 24, где рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

10 26. CAR по любому из пп. 1-17, нуклеиновая кислота по п. 18 или 19, рекомбинантный экспрессионный вектор по п. 20, клетка-хозяин по п. 21, популяция клеток по п. 22 или фармацевтическая композиция по п. 23 для применения в лечении или предупреждении рака у млекопитающего.

27. CAR, нуклеиновая кислота, рекомбинантный экспрессионный вектор, клетка-хозяин, популяция клеток или фармацевтическая композиция по п. 26, где рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

CAR CD33Mylo-BBZ (CAR CD33.1-BBz)

VH Mylo-VL Mylo	CD8	4-1BB	CD3 дзета
-----------------	-----	-------	--------------

CAR CD28Mylo-BBZ (CAR CD33.1-CD28z)

VH Mylo-VL Mylo	CD28	CD3 дзета
-----------------	------	--------------

CAR CD33M195-BBZ (CAR CD33.3-BBz)

VH M195-VL M195	CD8	4-1BB	CD3 дзета
-----------------	-----	-------	--------------

CAR CD33M195-CD28Z (CAR CD33.3-CD28z)

VH M195-VL M195	CD28	CD3 дзета
-----------------	------	--------------

CAR CD33Hu195-BBZ (CAR CD33.2-BBz)

VH Hu195-VL Hu195	CD8	4-1BB	CD3 дзета
-------------------	-----	-------	--------------

CAR CD33Hu195-CD28Z (CAR CD33.2-CD28z)

VH Hu195-VL Hu195	CD28	CD3 дзета
-------------------	------	--------------

ФИГ. 1А

CAR CD123-BBZ

VH CD123-VL CD123	CD8	4-1BB	CD3 дзета
-------------------	-----	-------	--------------

CAR CD123-CD28Z

VH CD123-VL CD123	CD28	CD3 дзета
-------------------	------	--------------

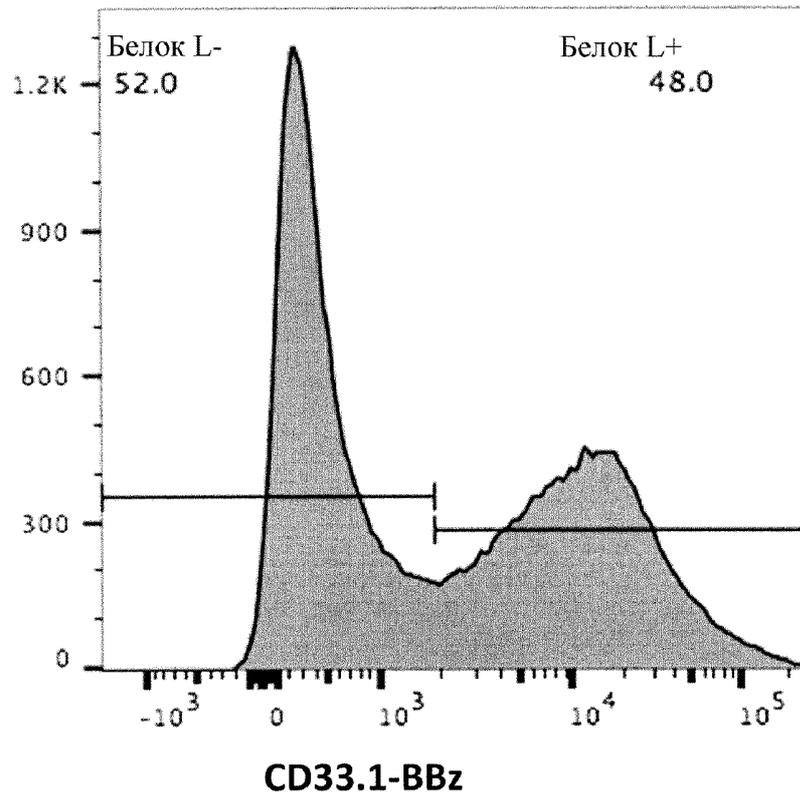
CAR CD33.2-BBz-mCherry

VH Hu195-VL Hu195	CD8	4-1BB	CD3 дзета	mCherry
-------------------	-----	-------	--------------	---------

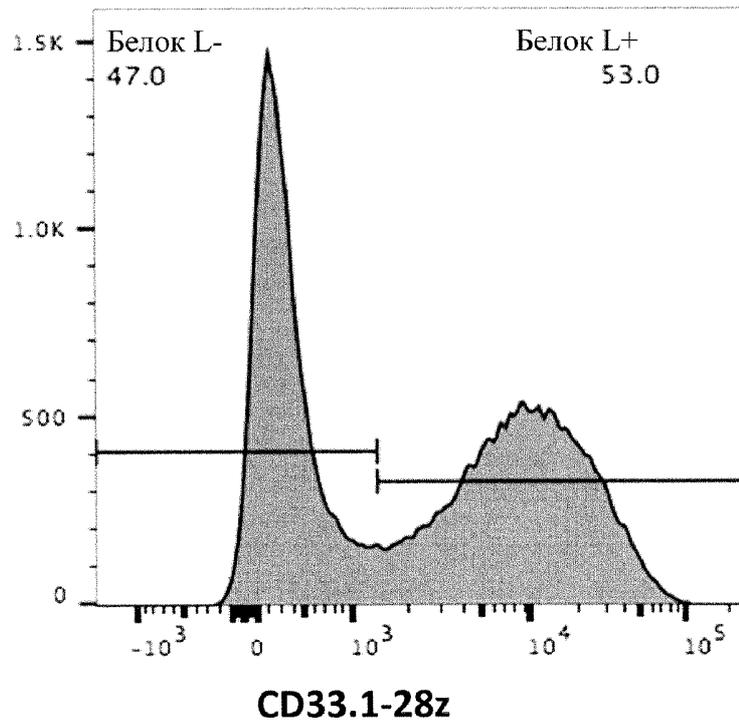
CAR CD33.2-CD28z-mCherry

VH Hu195-VL Hu195	CD28	CD3 дзета	mCherry
-------------------	------	--------------	---------

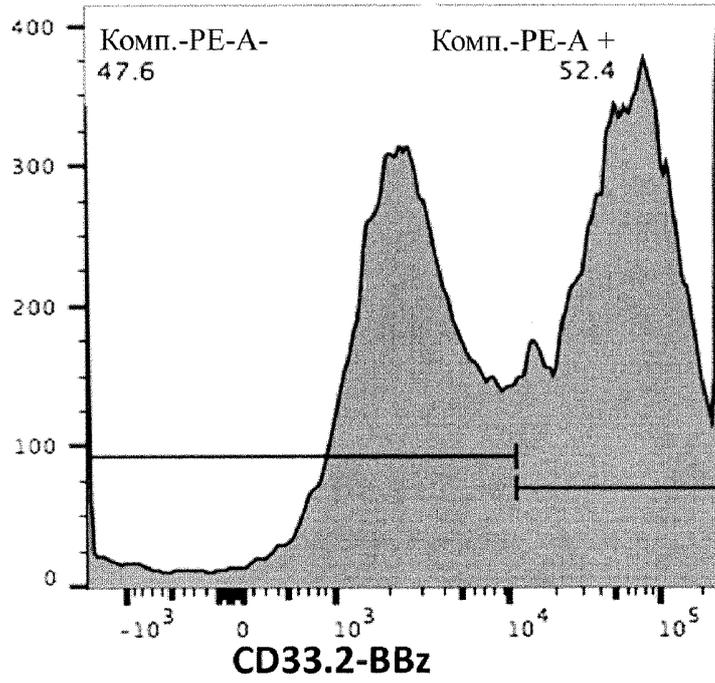
ФИГ. 1В



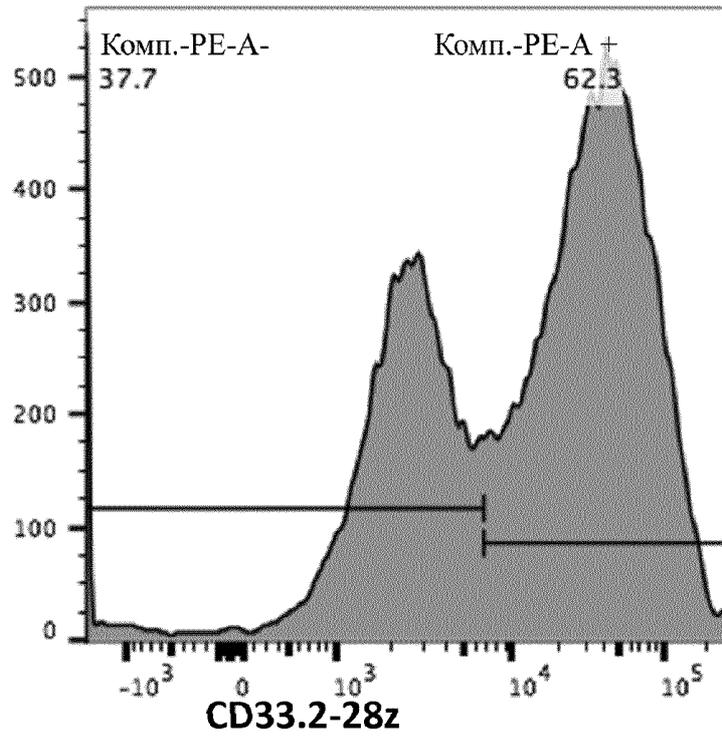
ФИГ. 2А



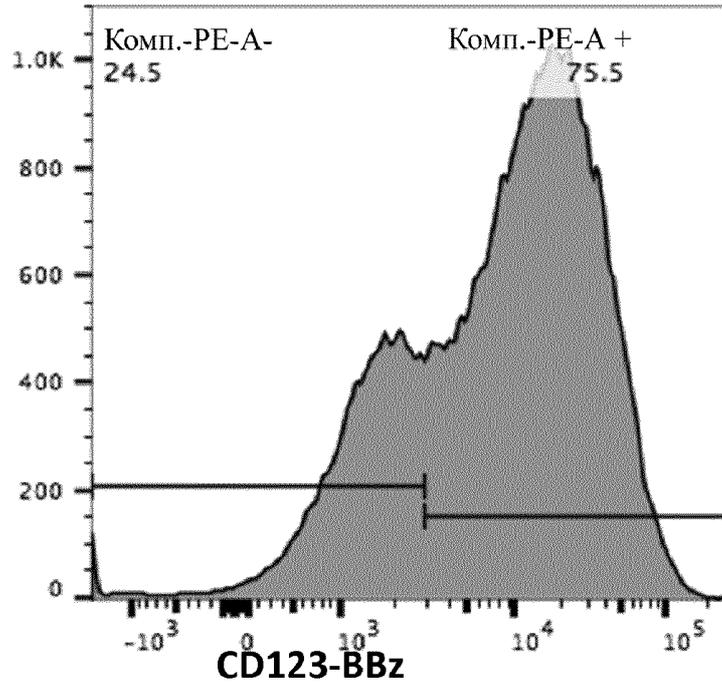
ФИГ. 2В



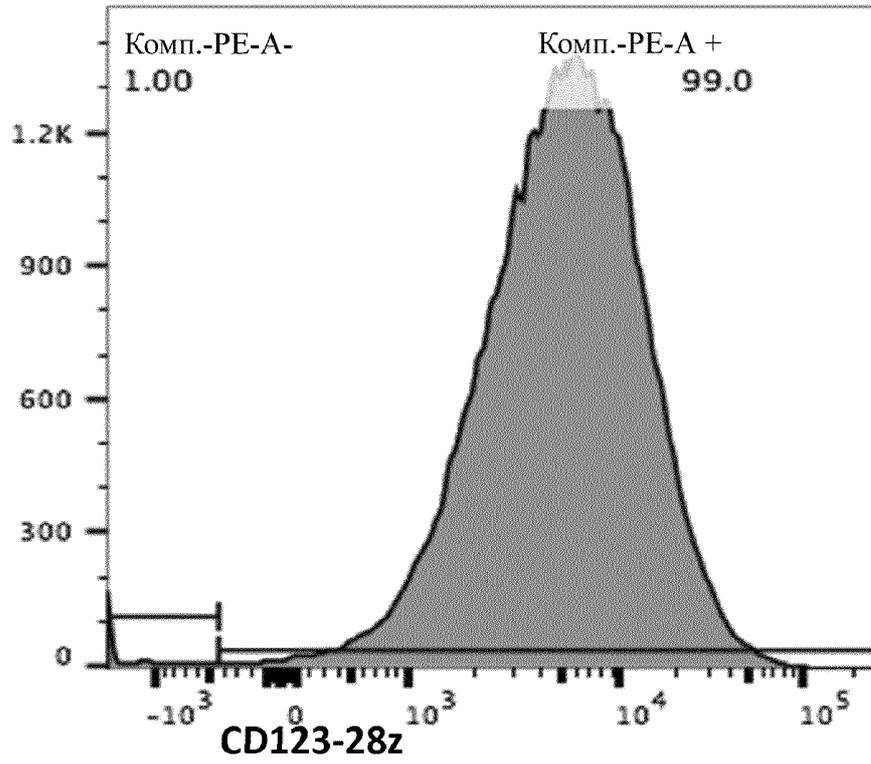
ФИГ. 2С



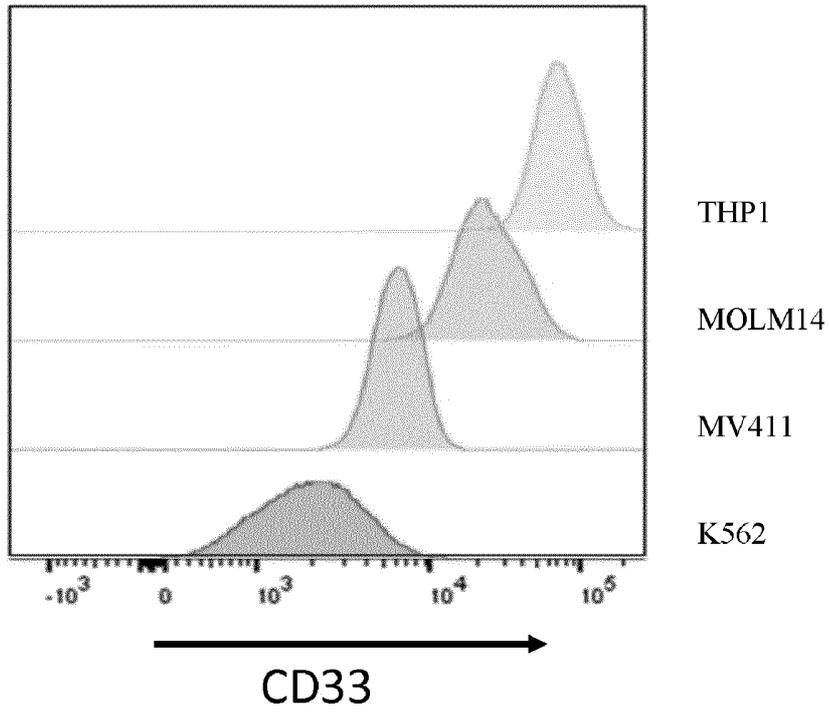
ФИГ. 2D



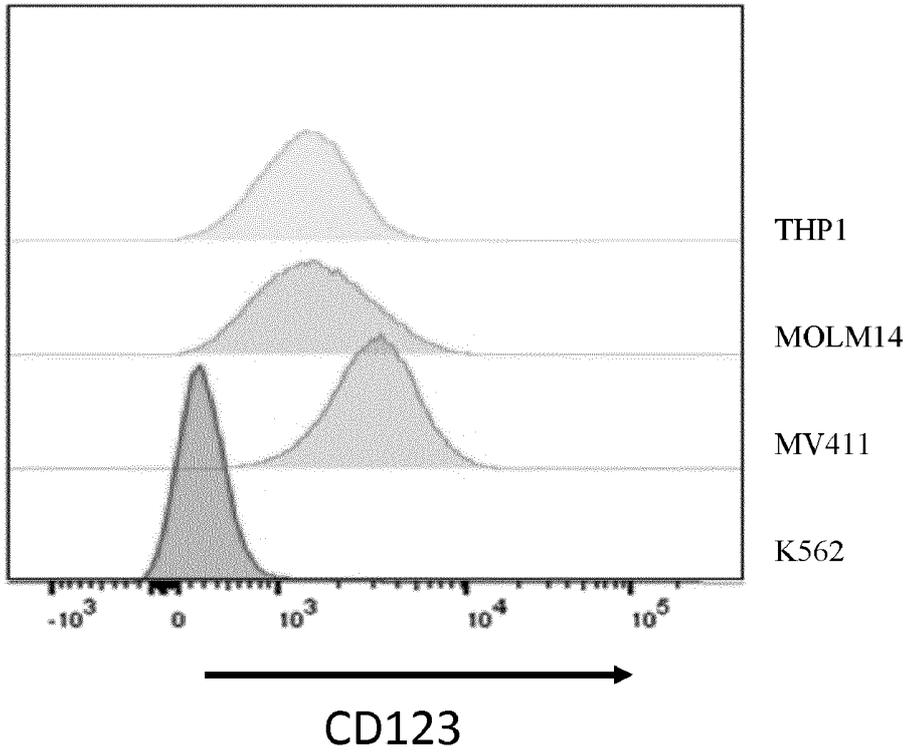
ФИГ. 2Е



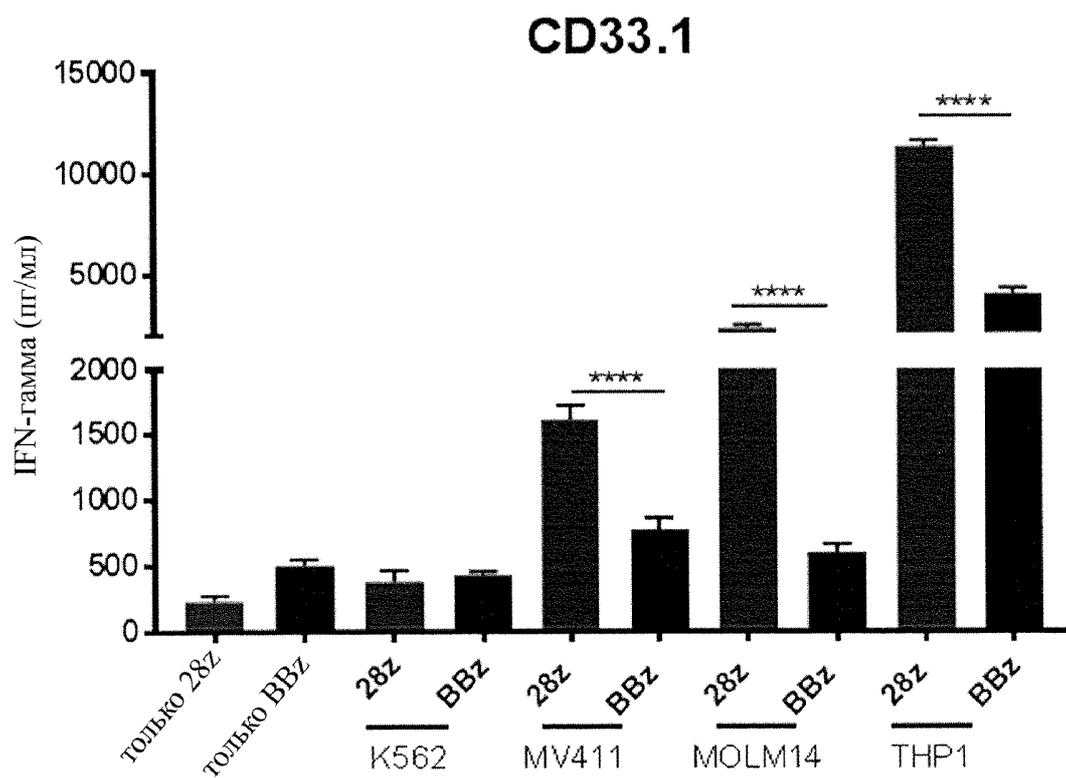
ФИГ. 2F



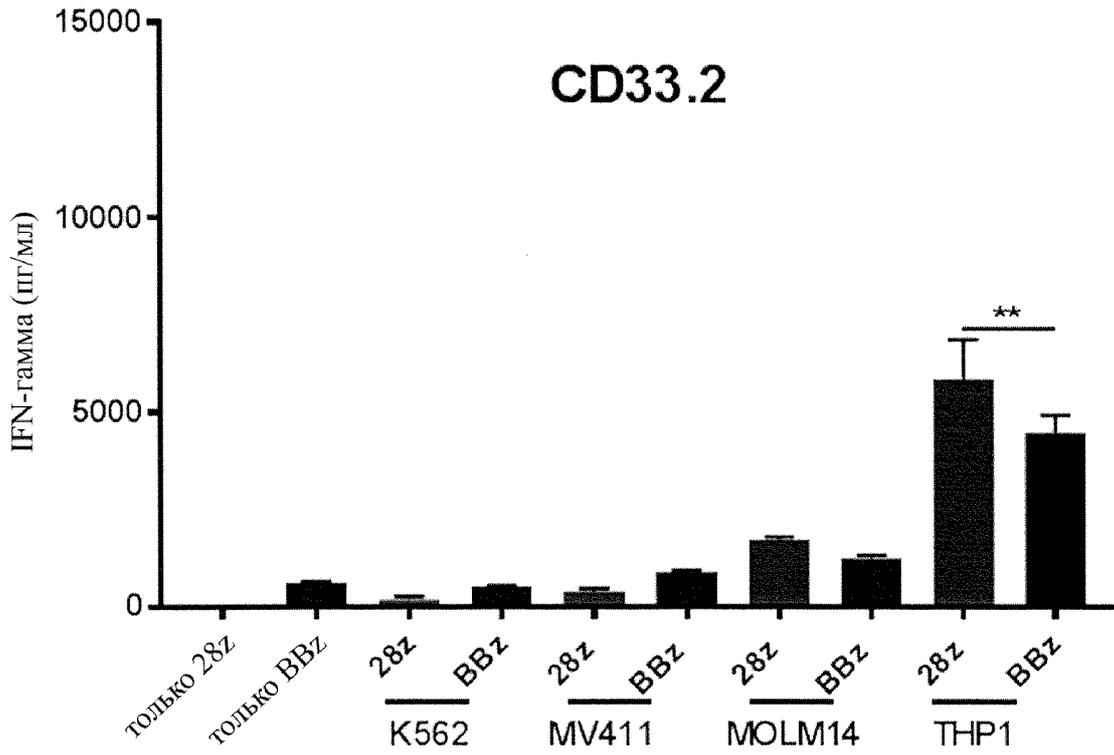
ФИГ. 3А

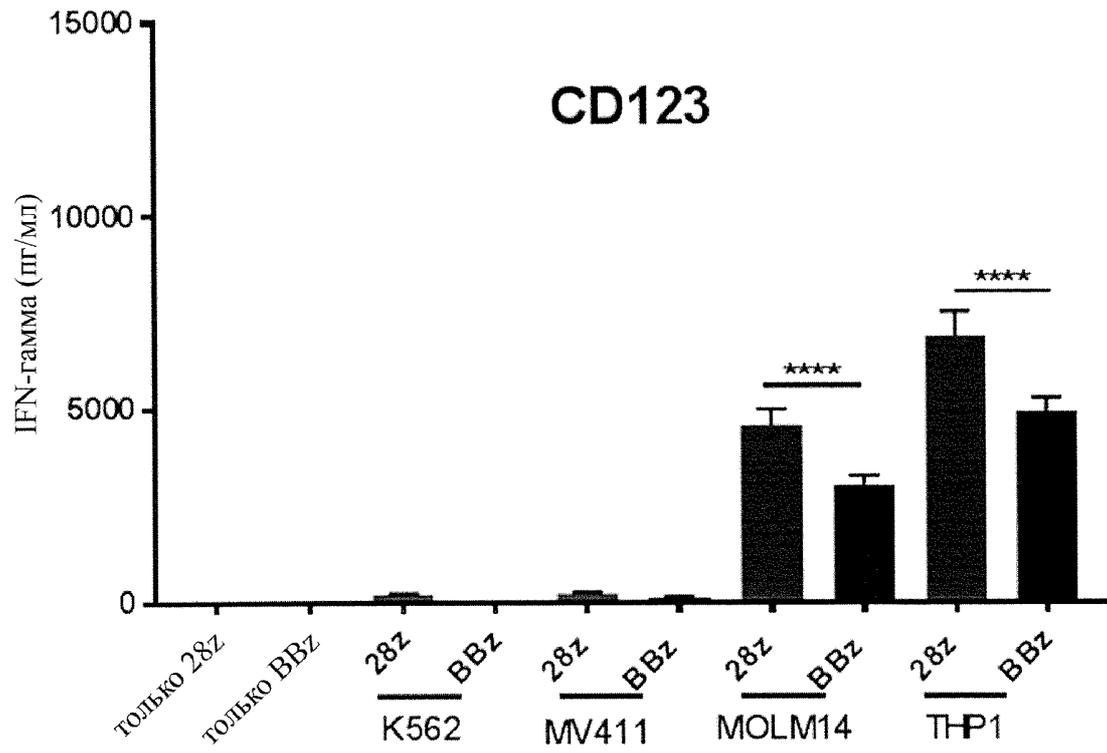


ФИГ. 3В

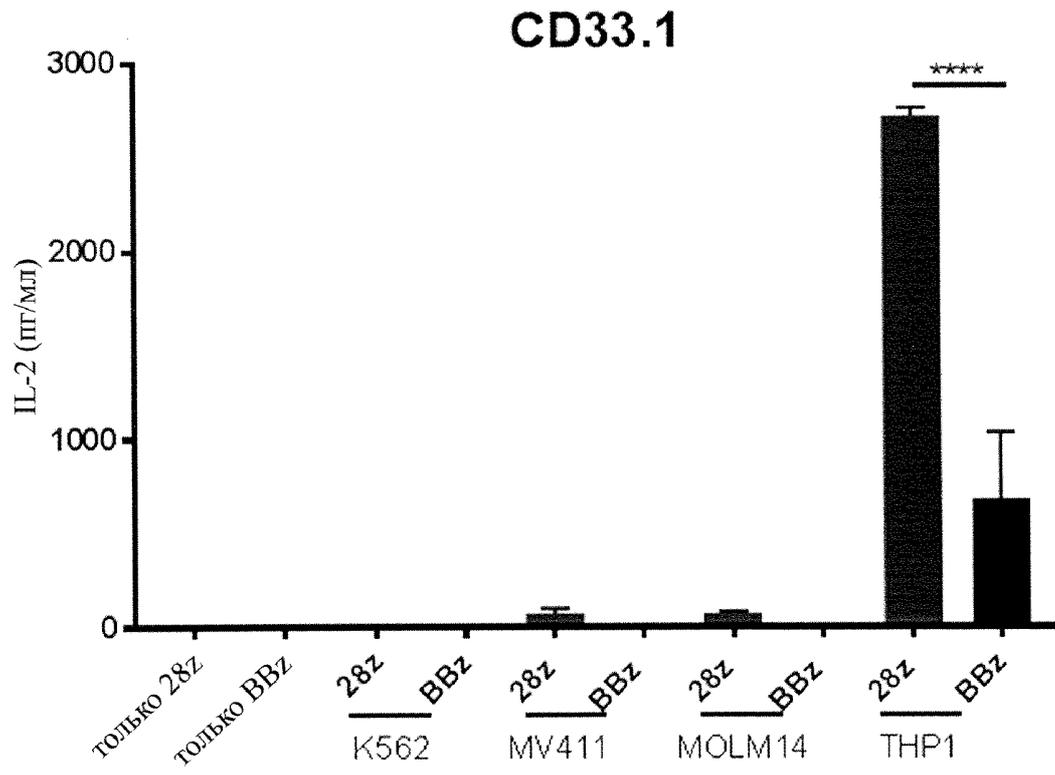


ФИГ. 4А

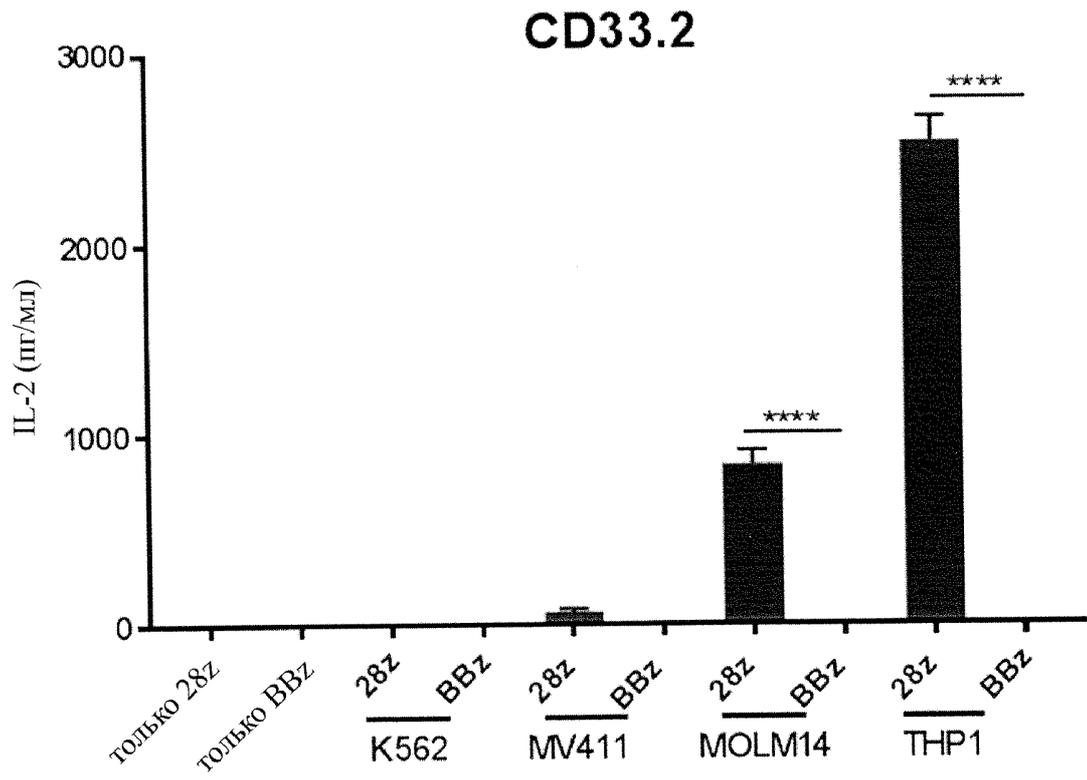




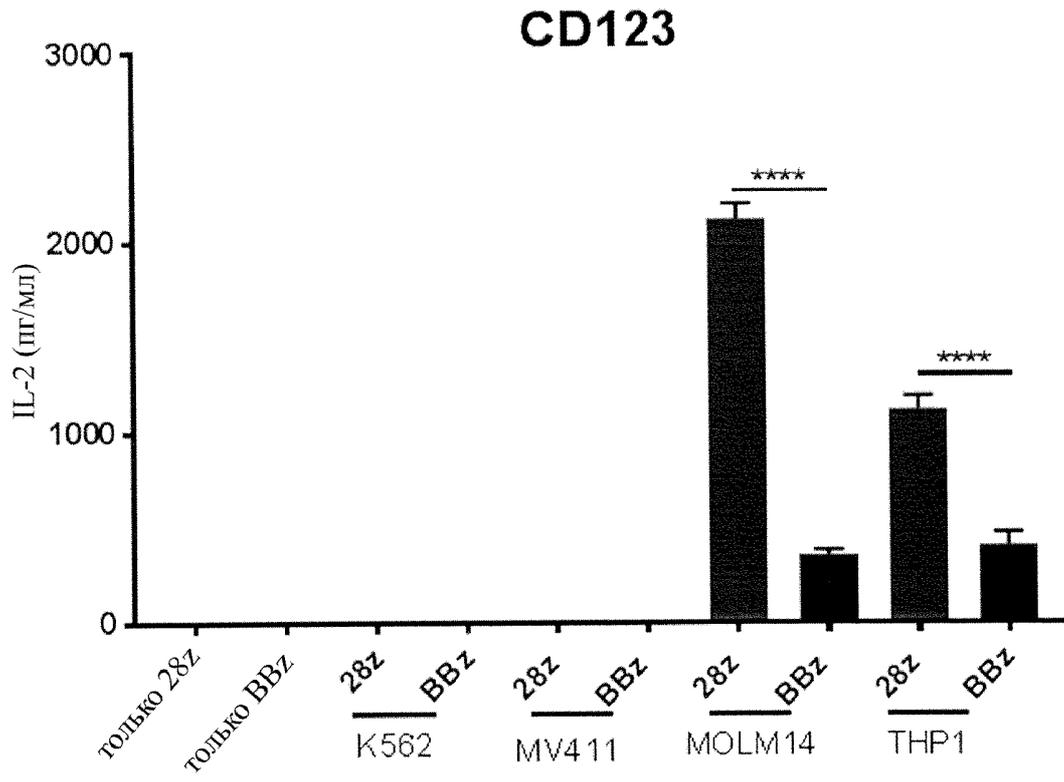
ФИГ. 4С



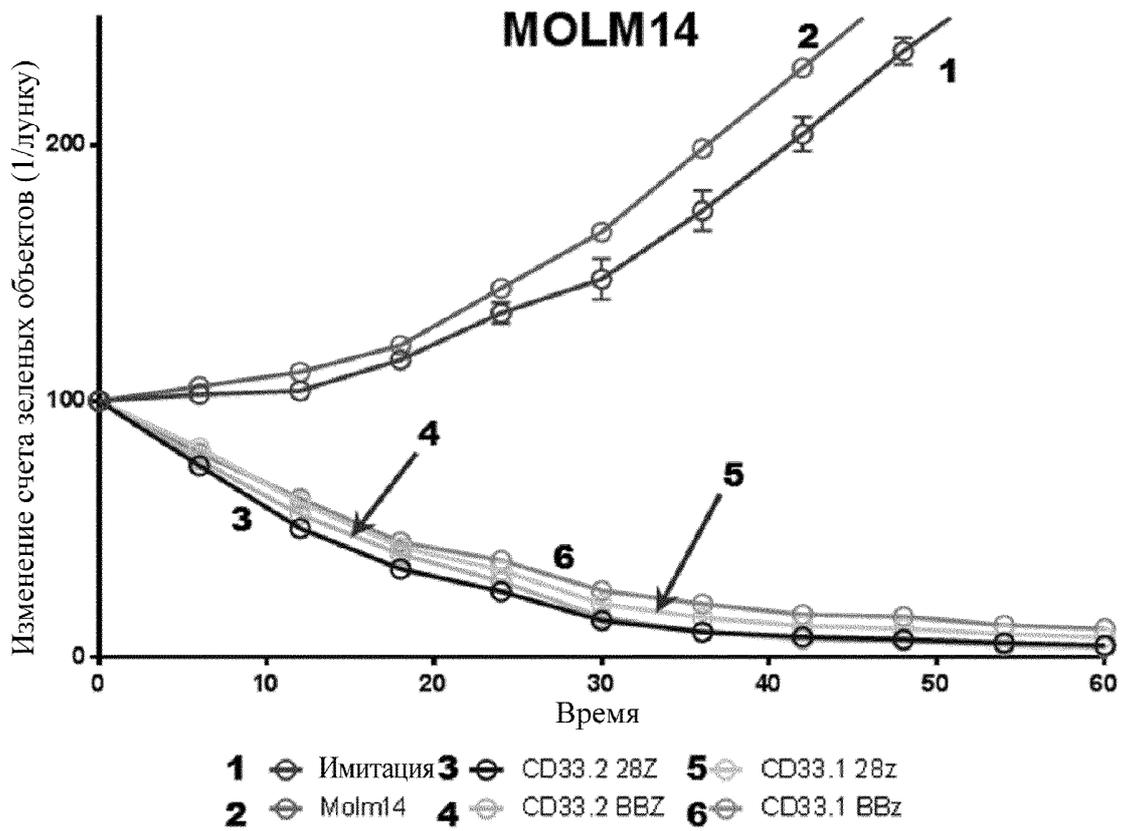
ФИГ. 4D



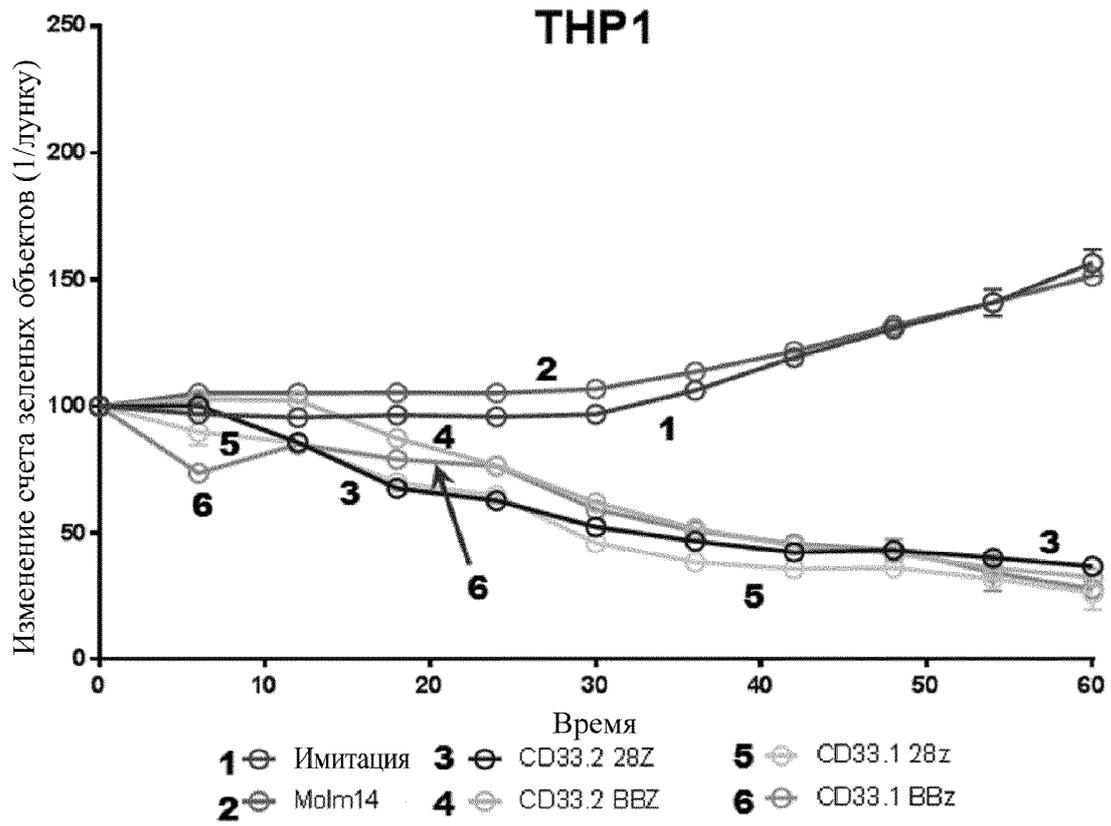
ФИГ. 4E



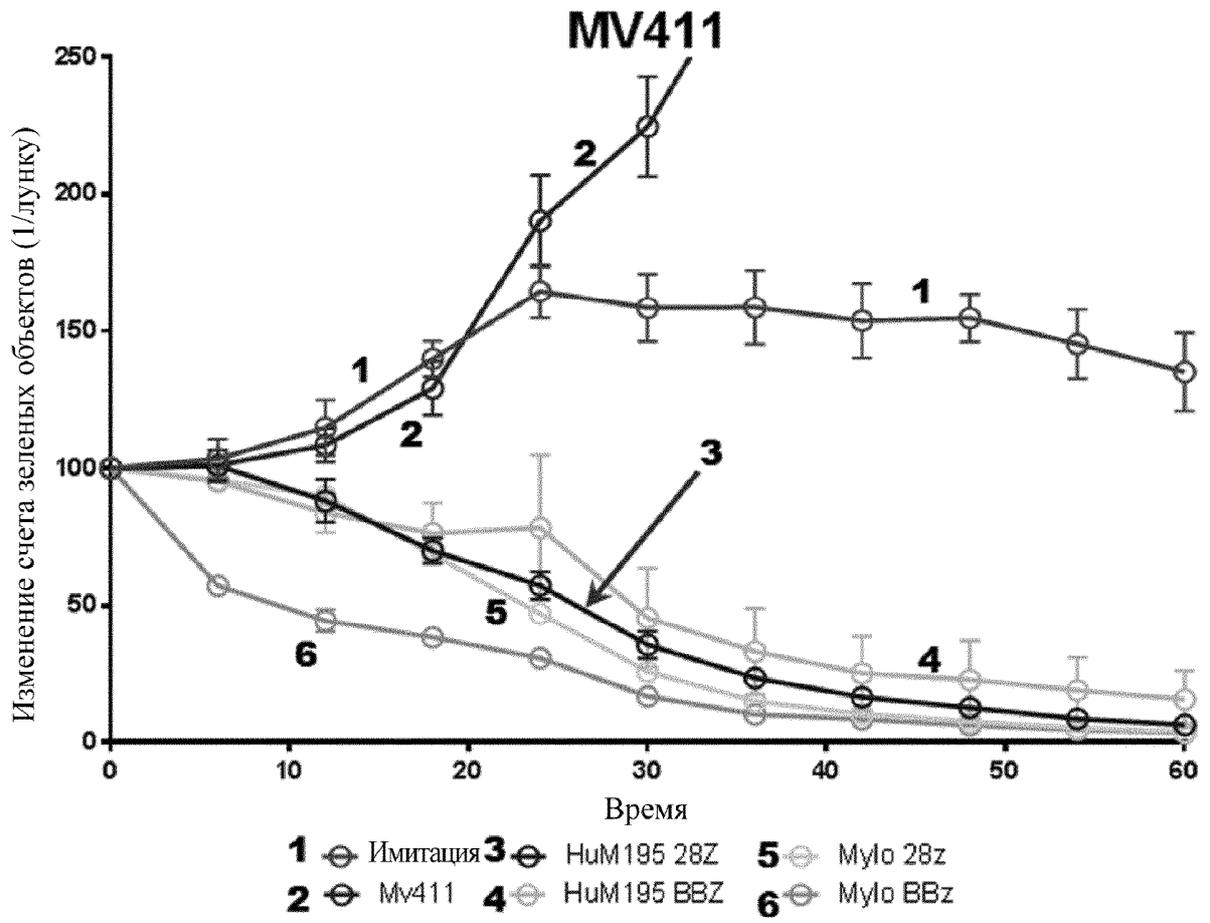
ФИГ. 4F



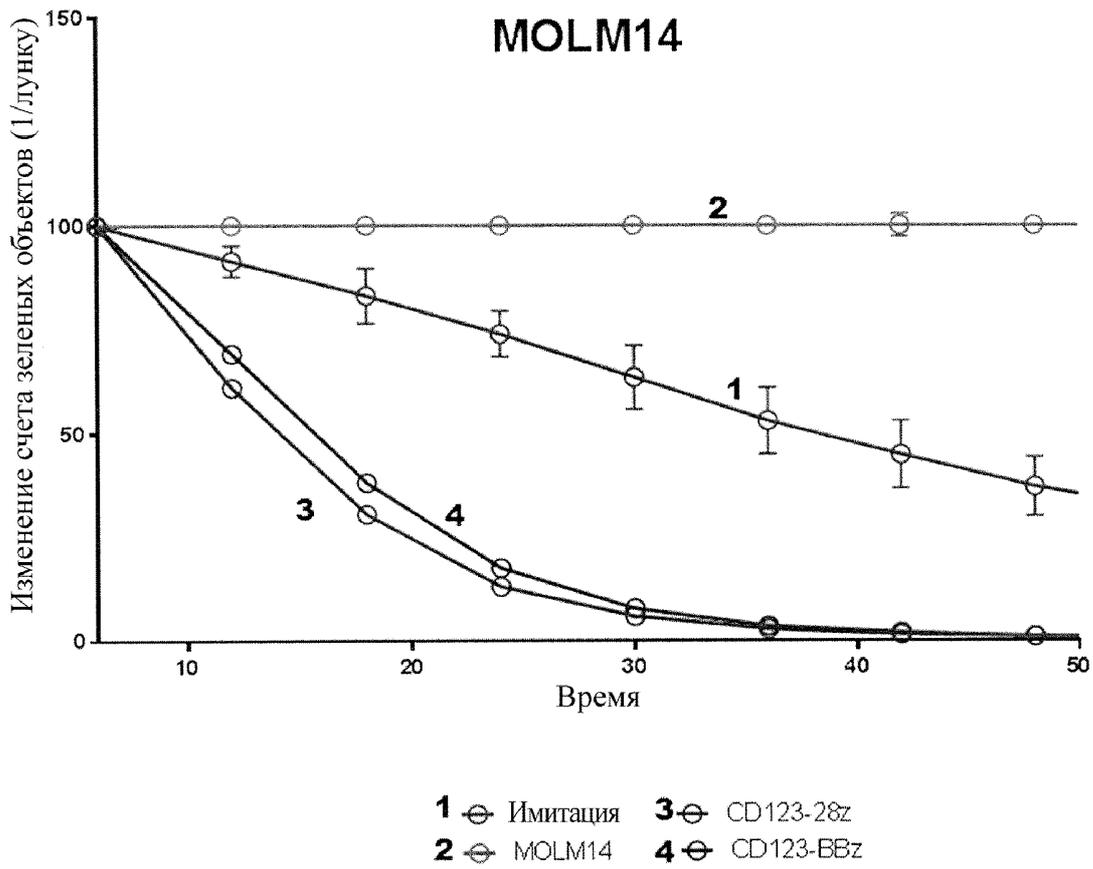
ФИГ. 5А



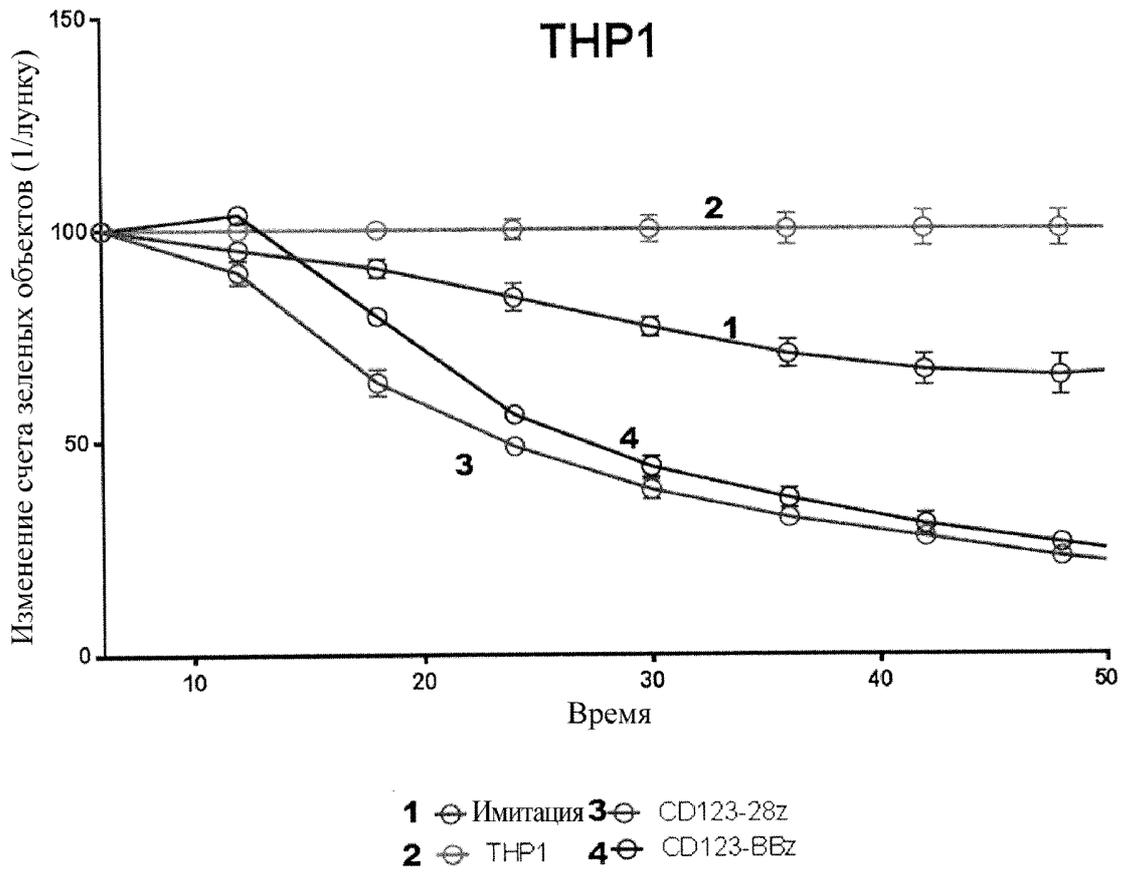
ФИГ. 5В



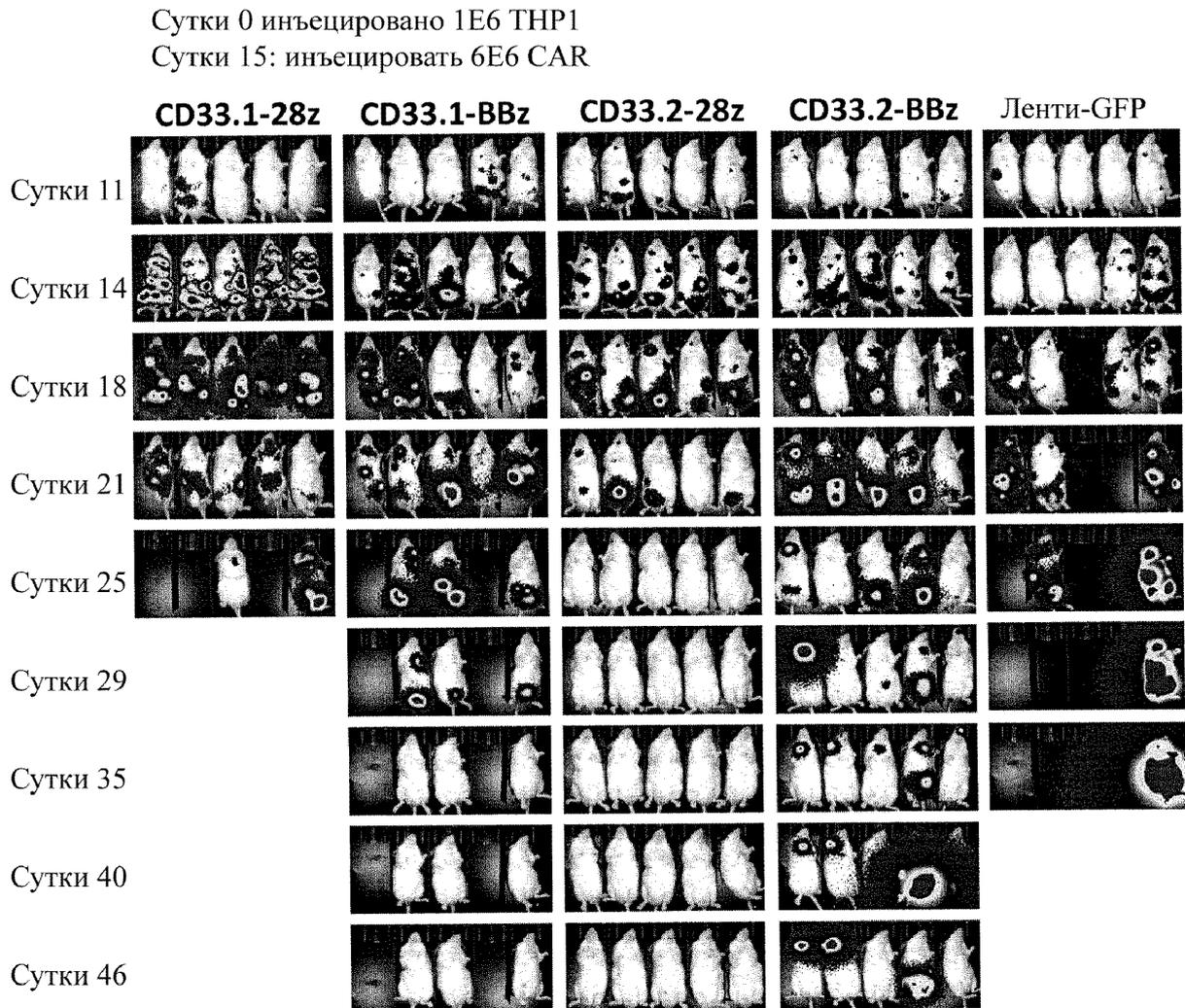
ФИГ. 5С



ФИГ. 5D

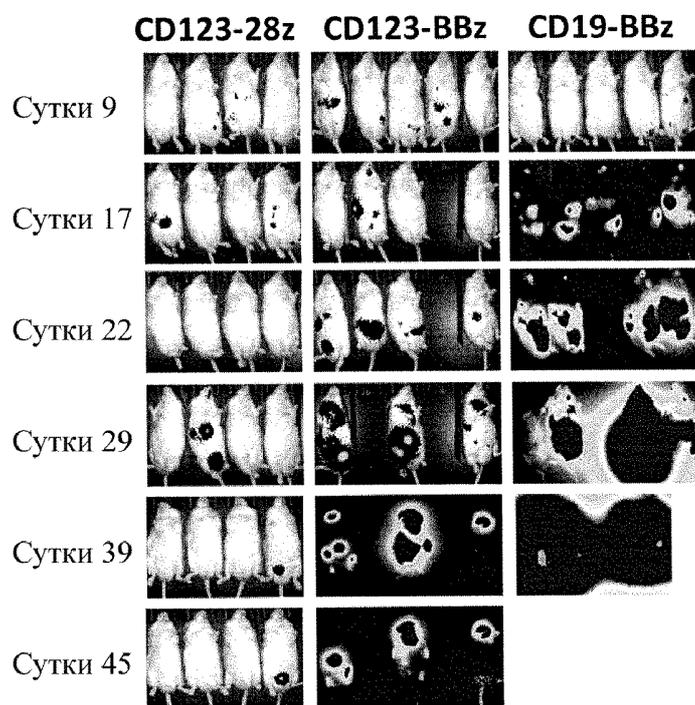


ФИГ. 5E



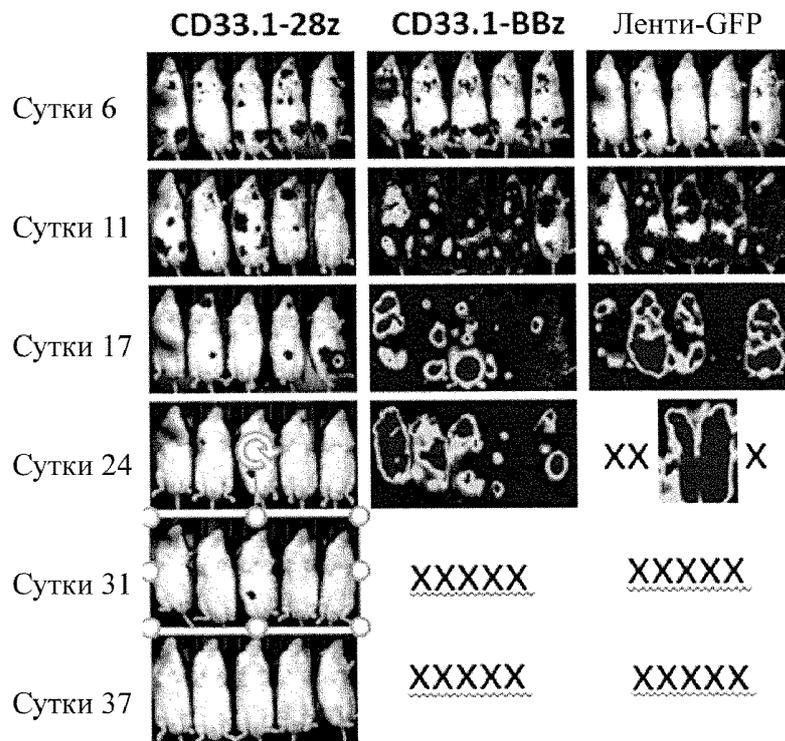
ФИГ. 6А

Сутки 0: инъецировано 1Е6 ТНР1
Сутки 15: ADT 6Е6 CAR



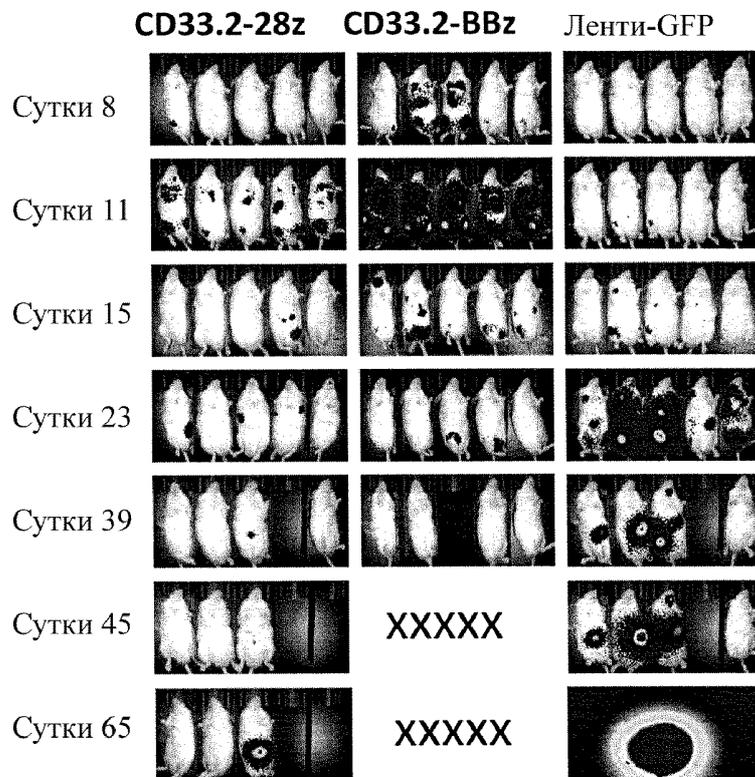
ФИГ. 6В

Сутки -7 1E6 MOLM14
Сутки 0: ADT 7E6 CAR



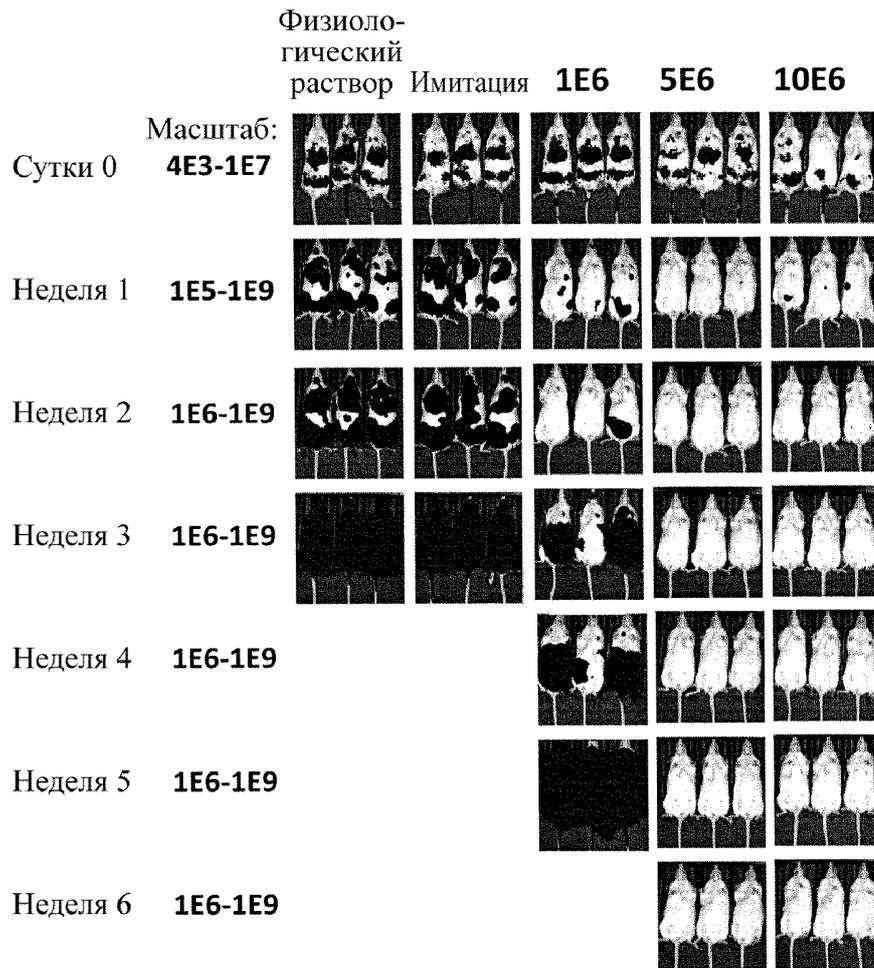
ФИГ. 6С

Сутки 0 1E6 MV411
Сутки 12: 6E6 CAR



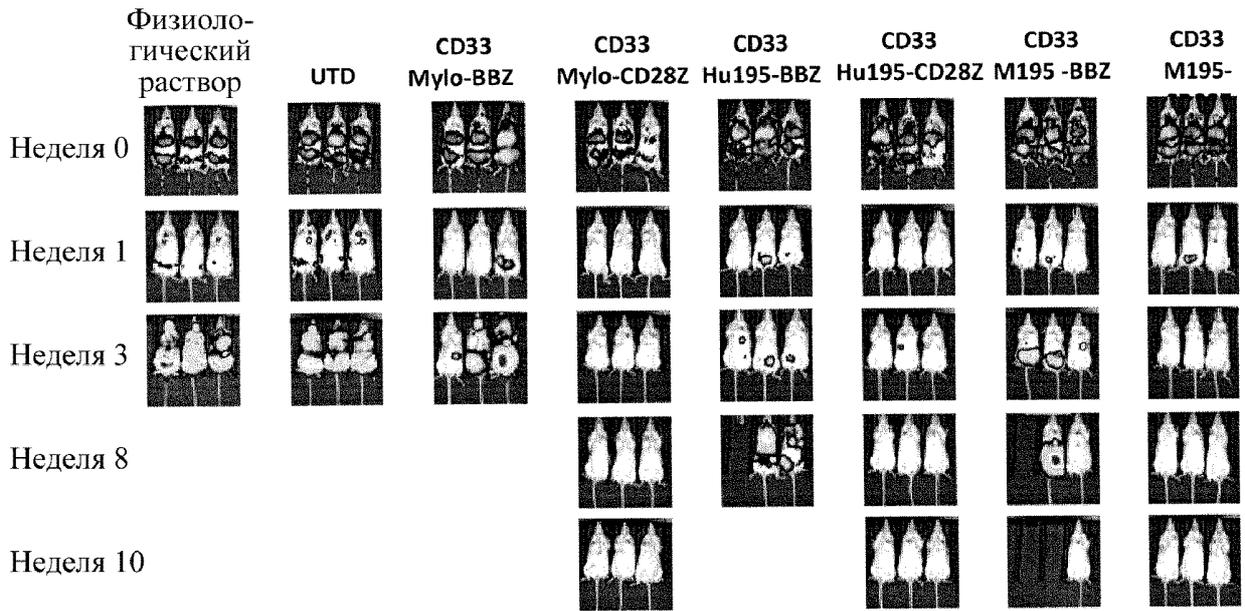
ФИГ. 6D

Сутки -7 1E6 MOLM14
 Сутки 0: ADT CAR

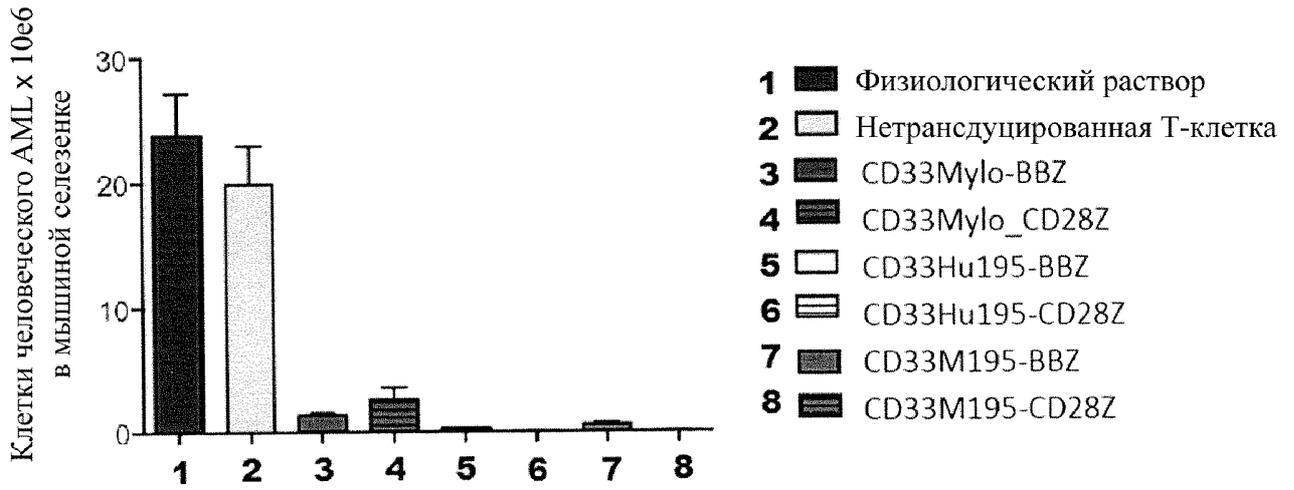


ФИГ. 6Е

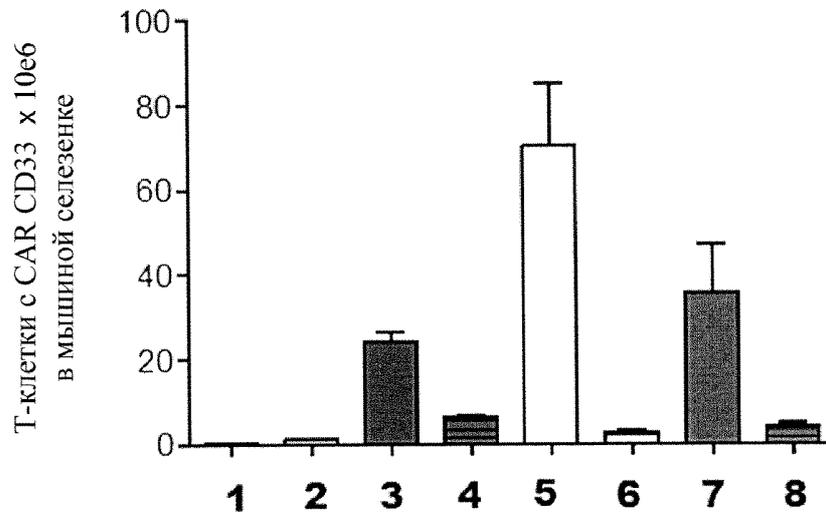
Сутки -7 1E6 JMM117
Сутки 0: ADT CAR



ФИГ. 7А

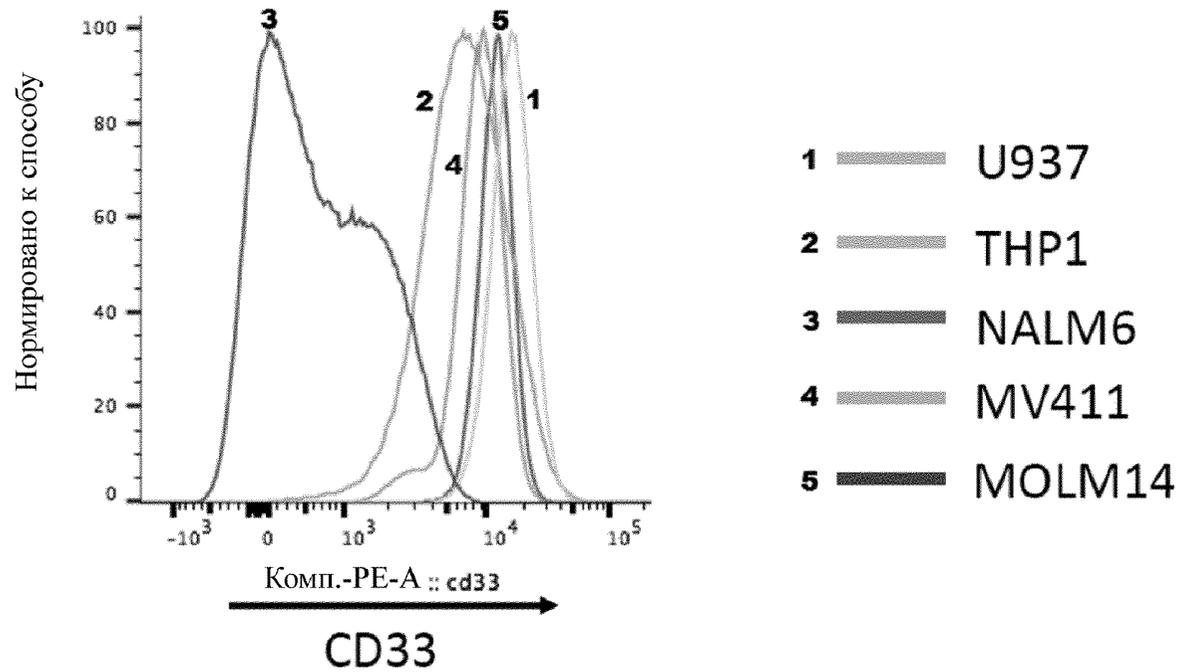


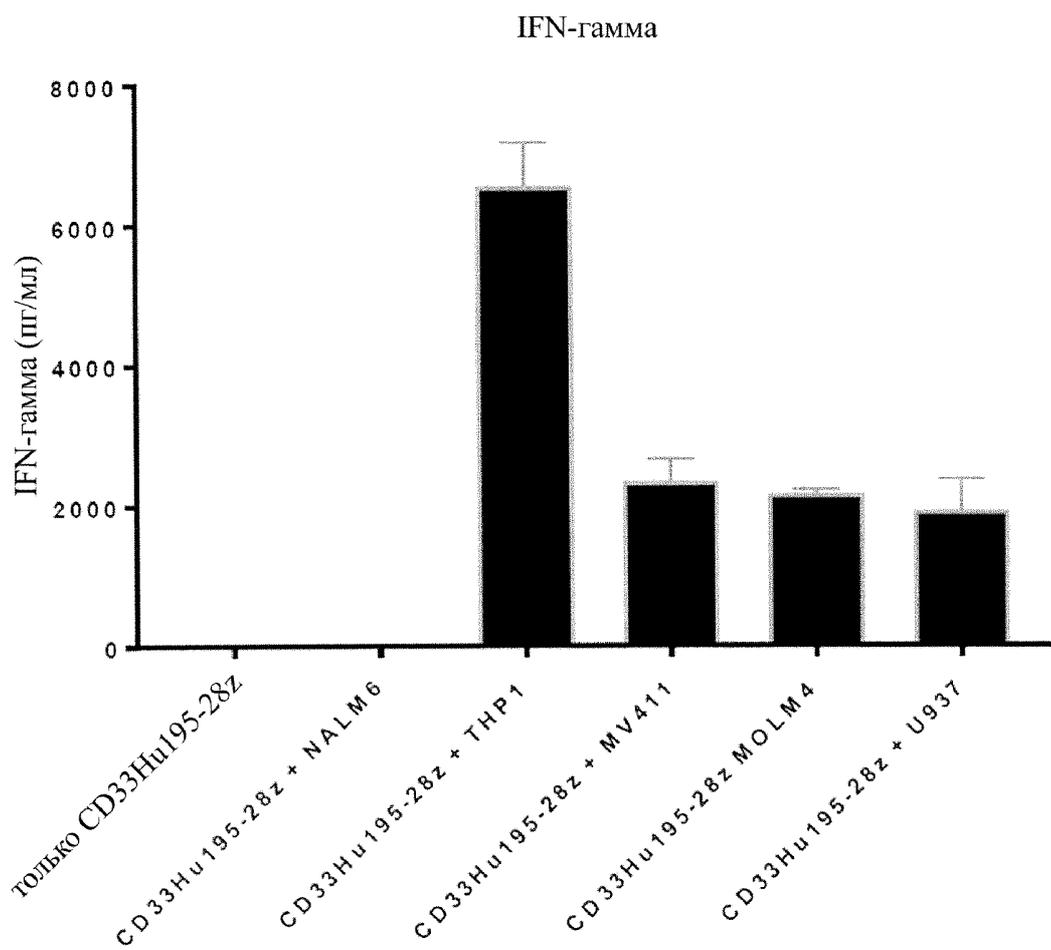
ФИГ. 7В



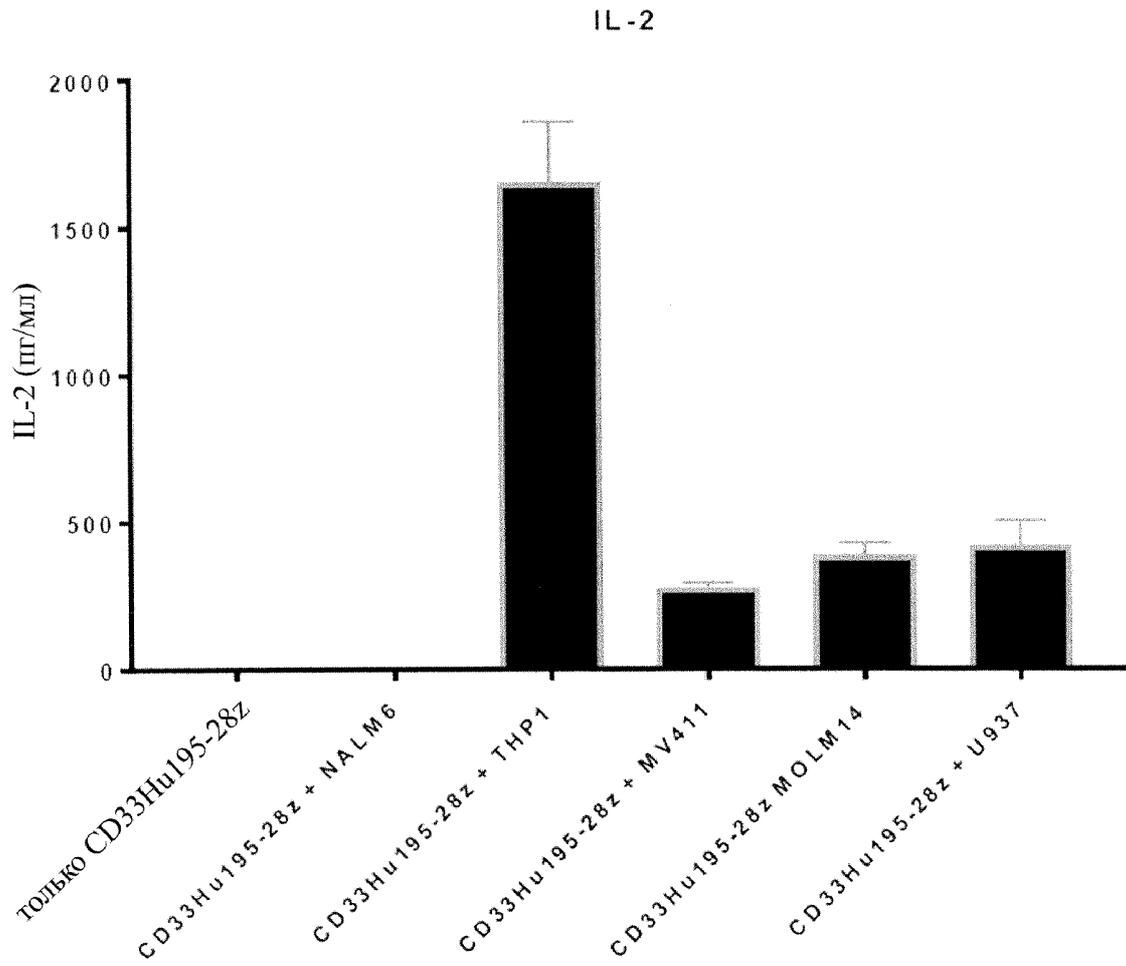
ФИГ. 7С

8. ФИГ.



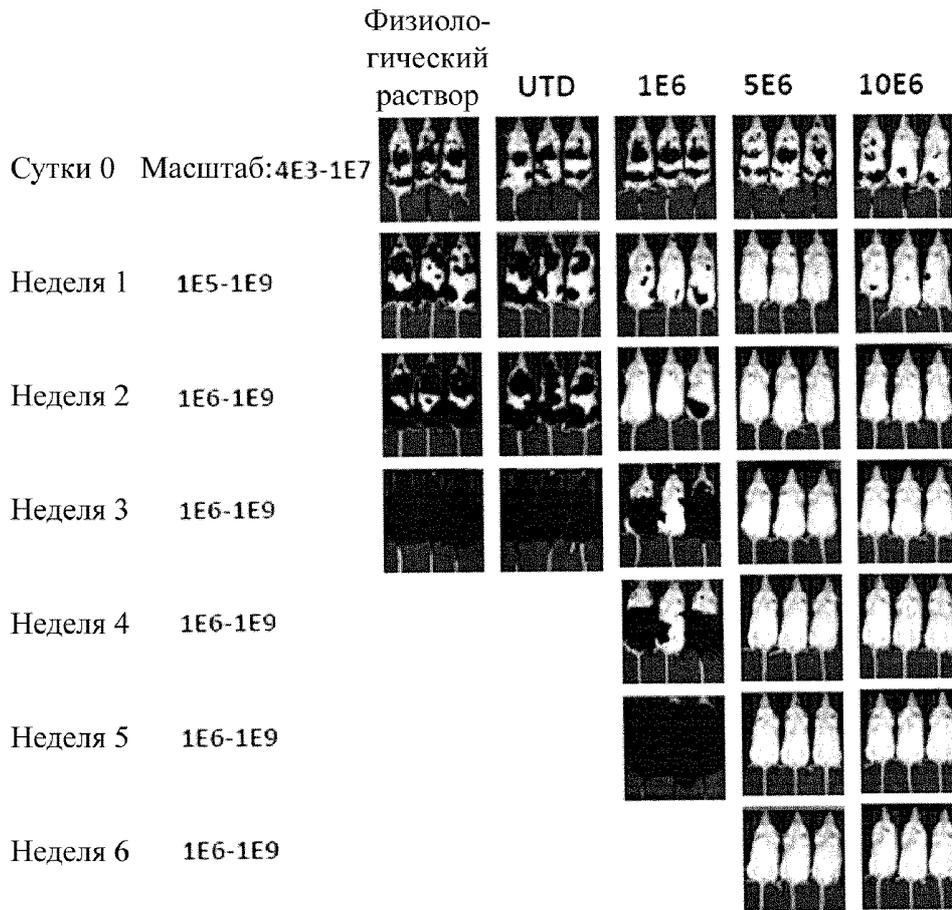


ФИГ. 9А

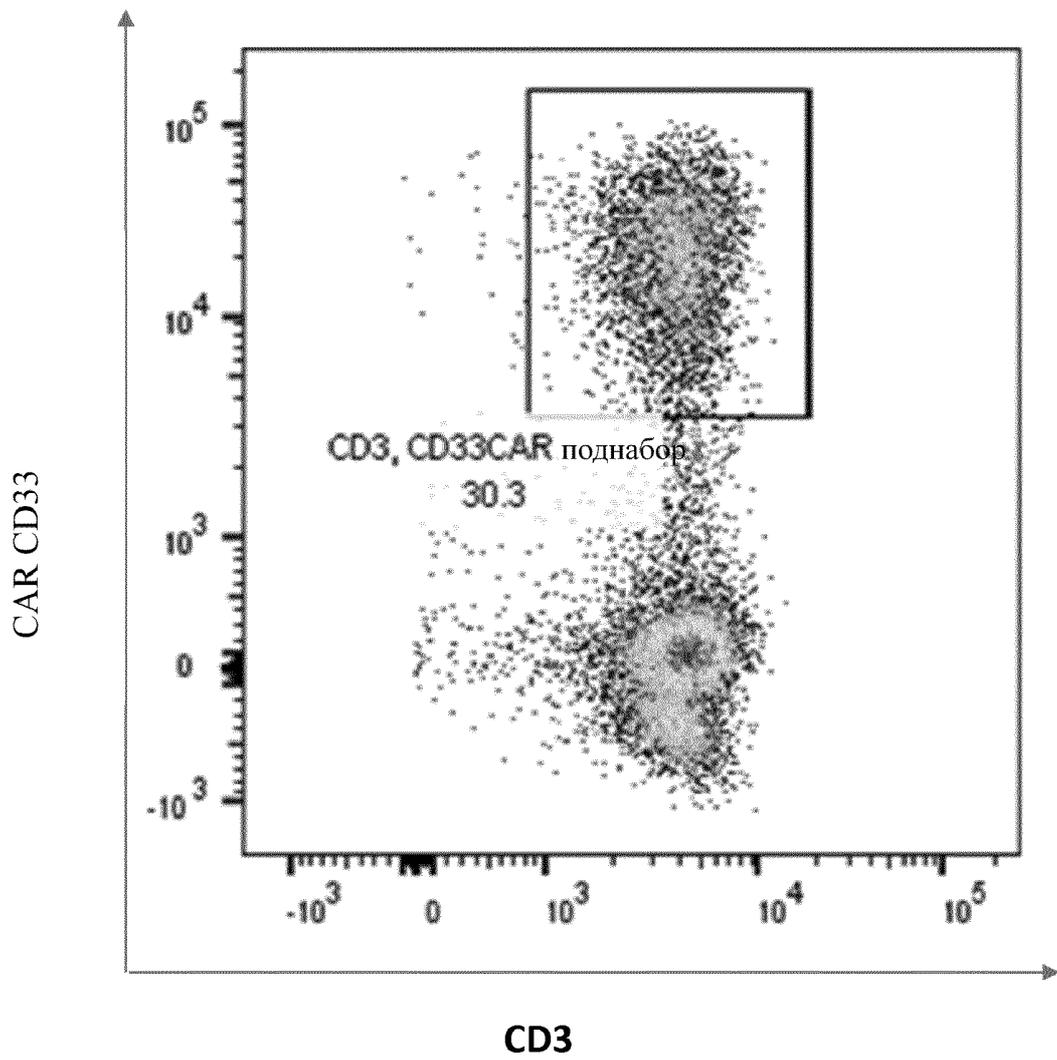


ФИГ. 9В

Сутки -7: 1E6 MOLM14
 Сутки 0: ADT CAR

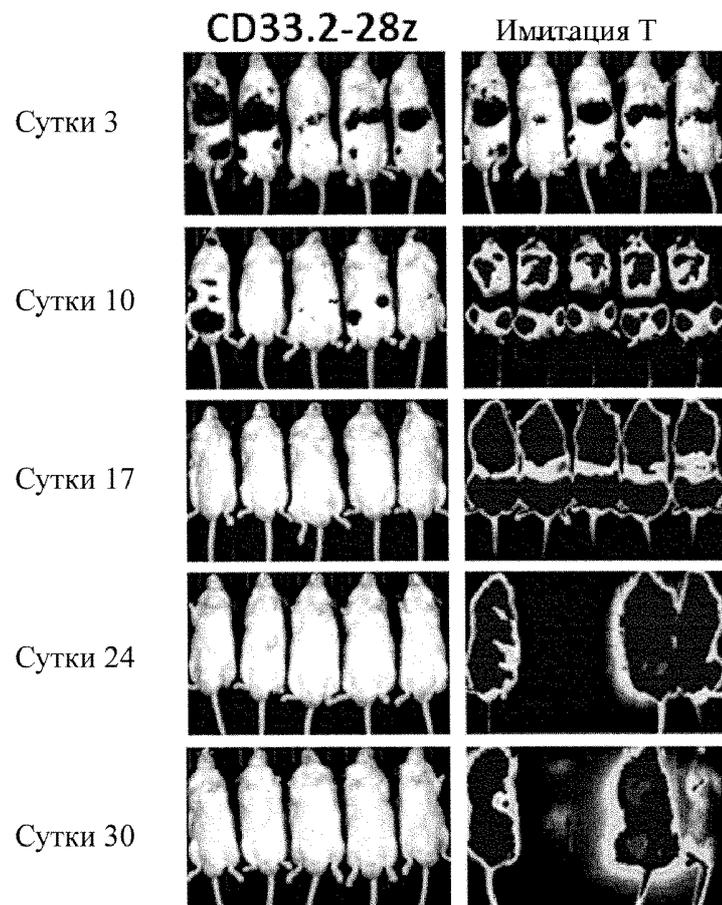


ФИГ. 10

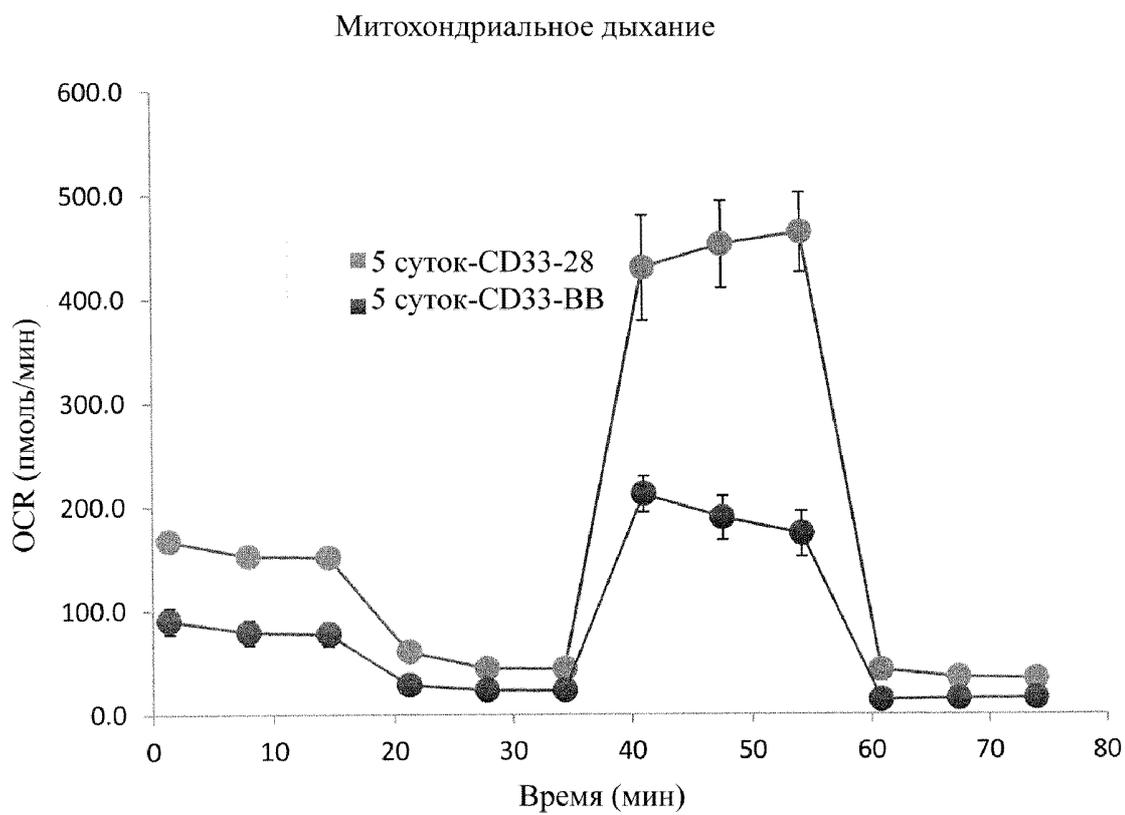


ФИГ. 11А

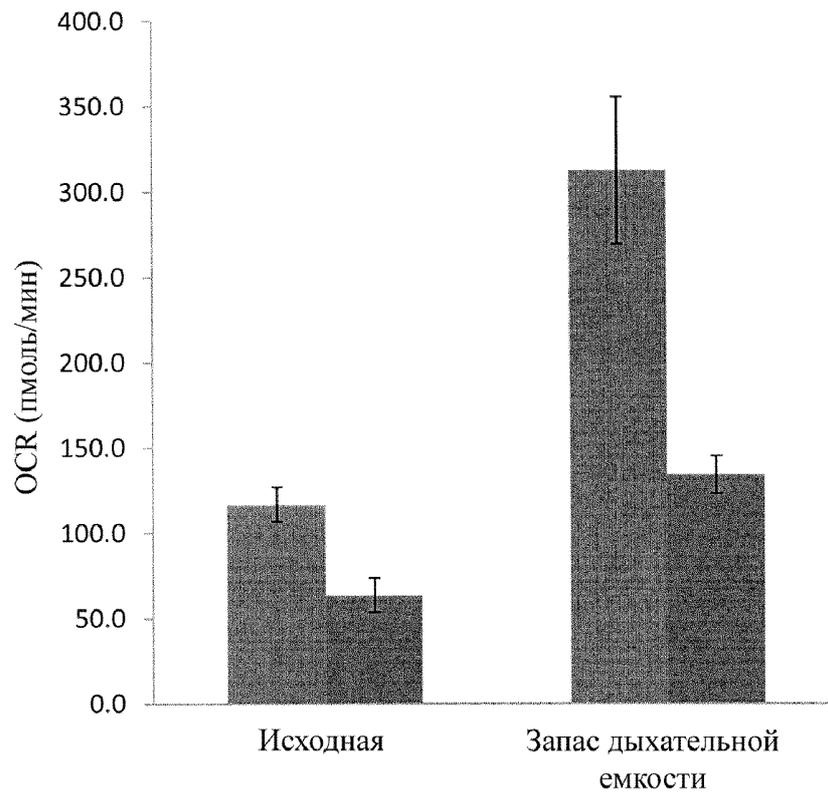
Сутки 0: в.в. 1Е6 MOLM14-GL
Сутки 3: АДТ 5Е6 Т-клеток CAR+

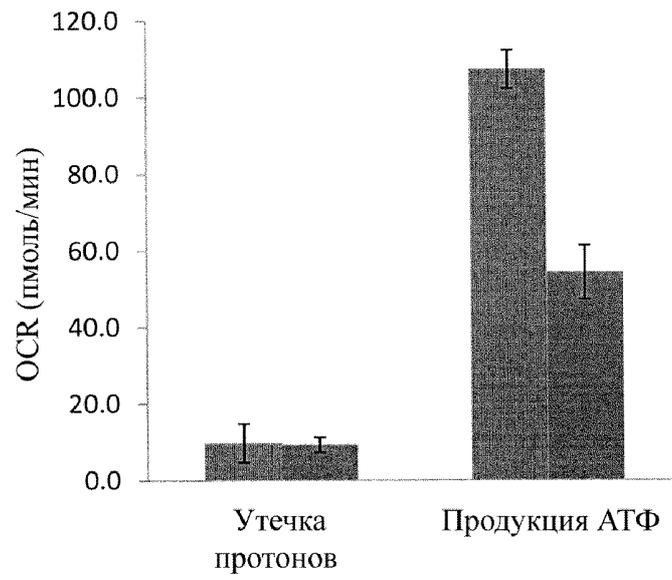


ФИГ. 11В

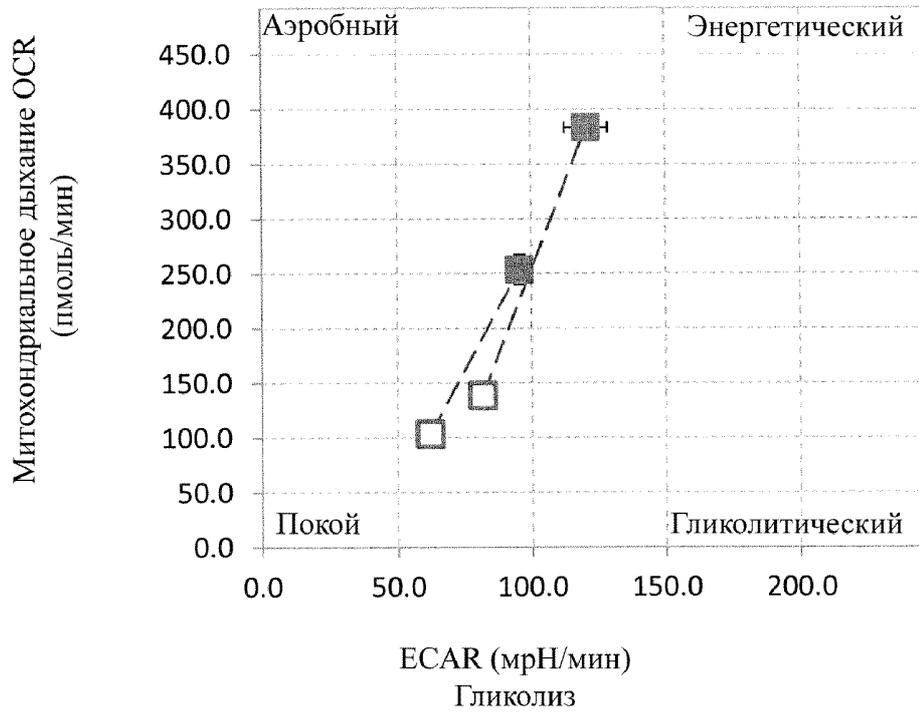


ФИГ. 12А

**ФИГ. 12В**

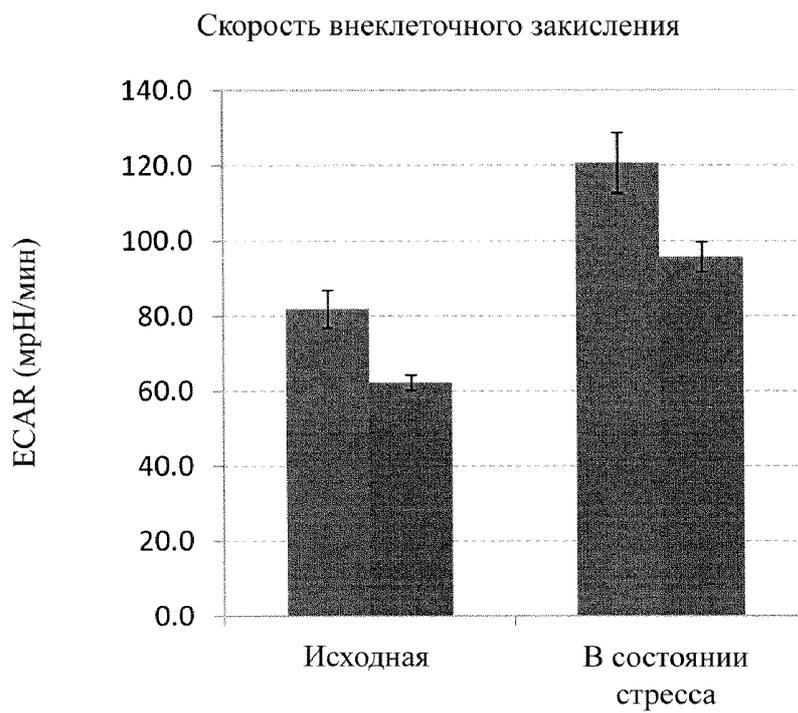
**ФИГ. 12С**

Энергетический фенотип клетки XF



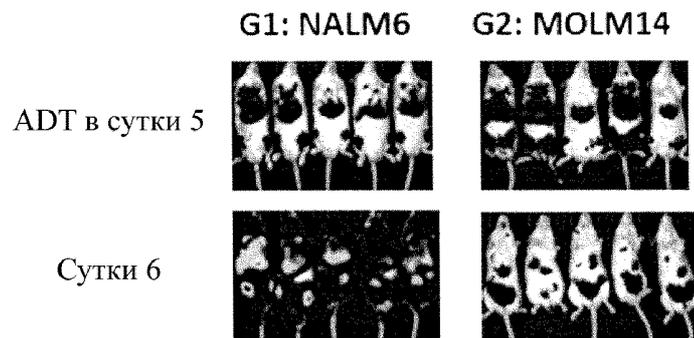
ФИГ. 12D

**ФИГ. 12E**



ФИГ. 12F

Сутки 0: в.в. 1E6 NAML6-GL или MOLM14-GL
Сутки 3: АДТ 3,5E6 Т-клеток CAR⁺



ФИГ. 13