

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202190926** (13) **A1**

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

**(43)** Дата публикации заявки  
**2021.06.25**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.10.01**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*C07K 14/54* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ В ОТНОШЕНИИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ И  
НЕСКОНСТРУИРОВАННЫХ  $\gamma\delta$  Т-КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ  
ОПУХОЛЕЙ**

---

**(31)** 62/739,822

**(32)** 2018.10.01

**(33)** US

**(86)** PCT/US2019/054132

**(87)** WO 2020/072536 2020.04.09

**(71)** Заявитель:  
ЭДИСЕТ БИО, ИНК. (US)

**(72)** Изобретатель:  
Сатпаев Даулет Кадил, Херрман  
Марисса Энн, Ромеро Джейсон  
Майкл, Цзин Ифэн Фрэнк, Ан Цили,  
Якобовиц Айя (US)

**(74)** Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

---

**(57)** Аспекты настоящего изобретения включают композиции и способы лечения гематологических опухолей с помощью сконструированных или несконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления  $\gamma\delta$  Т-клетки содержат конструкцию химерного антигенного рецептора (CAR). Конструкция CAR может содержать связывающий CD20 домен или связывающий домен к антигену созревания В-клеток (BCMA), шарнирный и трансмембранный домен CD8, костимулирующий домен, сигнальный домен CD3  $\zeta$ , их комбинацию или их все. Конструкция CAR может содержать домен, кодирующий секретируемый цитокин, содержащий общую гамма-цепь, такой как домен sIL15.

**A1**

**202190926**

**202190926**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568090EA/018

### КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ В ОТНОШЕНИИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ ИНЕСКОНСТРУИРОВАННЫХ $\gamma\delta$ Т-КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ОПУХОЛЕЙ

#### ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Эта заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/739 822, поданной 1 октября 2018 г., содержание которой полностью включено для всех целей.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0001.1]** Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и, таким образом, полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 17 декабря 2019 г., называется ADC-0005-PCT\_SL.txt и имеет размер 147616 байт.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Адоптивная клеточная терапия претерпевала почти постоянную итерацию в течение более тридцати (30) лет, от первых дней, сосредоточенных на основной активации лимфокинов и/или инфильтрации опухоли, до более поздних стратегий создания данных иммунных клеток для экспрессии генно-инженерных антигенных рецепторов, таких как химерные антигенные рецепторы (CAR). Несмотря на то, что на этом пути были некоторые намеки и указания на лечебный потенциал этих подходов, многое еще предстоит сделать. В частности, успешное уничтожение опухоли с помощью CAR-T-лимфоцитов зависит от персистенции CAR-T-клеток и эффекторной функции, но избыток любого из них может вызвать у пациента реакции «трансплантат против хозяина». Таким образом, в данной области техники исследуется множество стратегий костимуляции как T-, так и NK-клеток, и, в частности,  $\alpha\beta$  T-клеток, с целью достижения баланса между эффективностью и безопасностью. Примечательно, что практическое применение любого из этих различных подходов к аллогенным  $\gamma\delta$  T-клеткам в лучшем случае неопределенно, учитывая текущее отсутствие понимания требований дополнительной стимуляции  $\gamma\delta$  T-клеток по сравнению с  $\alpha\beta$  T-клетками. См., например, Ribot et al., "Searching for "signal 2": costimulation requirements of  $\gamma\delta$  T cells", Cell. Mol. Life Sci. (2011) 68:2345-2355.

[0003] Соответственно, по-прежнему необходимы улучшенные стратегии для повышения специфичности или селективности клеток, для повышения безопасности клеток, например, за счет уменьшения или предотвращения реакций «трансплантат против хозяина» (GVH; англ. graft versus host), для повышения эффективности клеток, например, избегая подавление эффекторных функций и улучшение активности, и/или выживаемости клеток при введении субъектам. Предлагаются способы, клетки, композиции, наборы и системы, отвечающие таким запросам.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Аспекты настоящего изобретения включают последовательность

выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит связывающий домен, который специфически связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью (ТАА; англ. tumor associated antigen), экспрессируемым на поверхности гематологической опухолевой клетки; шарнирный домен, например CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен, например CD8 $\alpha$ ; костимулирующую сигнальную область, причем необязательно костимулирующая сигнальная область выбрана из костимулирующей сигнальной области 4-1BB (CD137) и костимулирующей сигнальной области CD27; и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[0005] Аспекты настоящего изобретения дополнительно включают несконструированную  $\gamma\delta$  Т-клетку, как описано в настоящем документе, а также  $\gamma\delta$  Т-клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую конструкцию CAR, как описано в настоящем документе, причем  $\gamma\delta$  Т-клетка функционально экспрессирует кодируемый нуклеиновой кислотой CAR на поверхности  $\gamma\delta$  Т-клетки. Аспекты настоящего изобретения дополнительно включают множество сконструированных или несконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток, как описано в настоящем документе. Аспекты настоящего изобретения дополнительно включают способ получения  $\gamma\delta$  Т-клеток или множества  $\gamma\delta$  Т-клеток, описанных в настоящем документе, при этом способ включает трансфекцию  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) с помощью конструкции, описанной в настоящем документе. Аспекты настоящего изобретения дополнительно включают фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и  $\gamma\delta$  Т-клетку, или множество  $\gamma\delta$  Т-клеток, как описано в настоящем документе. Аспекты настоящего изобретения дополнительно включают приведение в контакт гематологической опухолевой клетки с эффективным для уничтожения опухолевых клеток количеством  $\gamma\delta$  Т-клеток, как описано в настоящем документе.

[0006] В одном аспекте в настоящем изобретении предложена последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит (а) связывающий домен, который специфически связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью (ТАА), экспрессируемым на поверхности гематологической опухолевой клетки; (b) шарнирный домен, такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ; (с) трансмембранный домен, такой как трансмембранный домен CD8 $\alpha$ ; (d) костимулирующую сигнальную область или комбинацию костимулирующих сигнальных областей, необязательно при этом костимулирующая сигнальная область выбрана из костимулирующей сигнальной области 4-1BB (CD137) и костимулирующей сигнальной области CD27; и (е) сигнальный домен, такой как сигнальный домен CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления, вышеуказанные элементы (а) - (е) кодируются на смысловой цепи выделенной нуклеиновой кислоты в порядке от 5' до 3'.

[0007] В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен специфически связывается с CD20. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен селективно связывается с эпитопом в пределах CD20, связанным антителом к CD20, или

конкурирует за связывание с антителом к CD20, выбранным из группы, состоящей из 3B9, 3H7, 2B7 и 9C11, предпочтительно 3H7. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен содержит определяющие комплементарности области антитела к CD20, выбранного из группы, состоящей из 3B9, 3H7, 2B7 и 9C11, предпочтительно 3H7.

[0008] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует последовательность переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и последовательность переменных областей легкой цепи (LCVR), например: при этом последовательности HCVR и LCVR представляют собой SEQ ID NO: 99 и 107 соответственно; последовательность определяющей комплементарности области тяжелой цепи 1, 2 и 3 - SEQ ID NO: 101, 103 и 105 соответственно, и последовательность определяющей комплементарности области легкой цепи 1, 2 и 3 - SEQ ID NO: 109, 111 и 113 соответственно; последовательность определяющей комплементарности области тяжелой цепи 3 (HCDR3) и легкой цепи CDR3 (LCDR3), при этом HCDR3 и LCDR3 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 345 и 353; 201 и 209; и 249 и 257; последовательность переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и последовательность переменных областей легкой цепи (LCVR), при этом последовательности HCVR и LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 339 и 347; 195 и 203; и 243 и 251; и/или домен определяющей комплементарности области тяжелой цепи 3 (HCDR3) и домен легкой цепи CDR3 (LCDR3), при этом домен HCDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, при этом X1=A, V или T; X2=K; X3=D; X4=P, F или G; X5=S или H; X6=Y; X7=G; X8=S или H; X9=G или F; X10=S или Y; X11=Y, N или S; X12=Y, G или H; X13=G, L или S; X14=Y, M или D; X15=Y, D или V; X16 =G, V или отсутствует; X17=M или отсутствует; X18=D или отсутствует; X19=V или отсутствует (SEQ ID NO: 369); и домен LCDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9, при этом X1=Q; X2=Q; X3=R или S; X4=N, Y или F; X5=N, D, или Y; X6=W; X7=P; X8=L; X9=T (SEQ ID NO: 370).

[0009] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий домен, который специфически связывается с CD19 или BCMA. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен специфически связывается с BCMA. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен избирательно связывается с эпитопом в пределах BCMA, связанным антителом к BCMA, или конкурирует за связывание с областью связывания к BCMA, имеющей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 и 28; SEQ ID NO: 29 и 30; и SEQ ID NO: и 31 и 32. В некоторых вариантах осуществления, b. связывающий домен содержит определяющие комплементарности области области связывания к BCMA, имеющей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 и 28; SEQ ID NO: 29 и 30; и SEQ ID NO: и 31 и 32.

[0010] В некоторых вариантах осуществления, любого из вышеперечисленного или описанного в настоящем документе, CAR содержит: шарнирный домен CD8 $\alpha$ ,

содержащий SEQ ID NO:1 (PTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY); или SEQ ID NO:2 (TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY). В некоторых вариантах осуществления, любого из вышеперечисленного или описанного в настоящем документе, CAR содержит трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , содержащий SEQ ID NO:3 (IWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC).

[0011] В некоторых вариантах осуществления, любого из вышеперечисленного или описанного в настоящем документе, CAR содержит сигнальный домен CD3 $\zeta$ , содержащий SEQ ID NO:4 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPPEMGGKPKRRKPNQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR ) или SEQ ID NO:5 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPPEM GGKPKRRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR).

[0012] В некоторых вариантах осуществления, любого из вышеперечисленного или описанного в настоящем документе, CAR содержит костимулирующую сигнальную область 4-1BB, содержащую SEQ ID NO: 6 (KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL); или костимулирующую сигнальную область CD27, содержащую SEQ ID NO:7. (QRRKYRSNKGESPVEPAEPCH YSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP). В некоторых вариантах осуществления, любого из вышеперечисленного или описанного в настоящем документе, выделенная нуклеиновая кислота кодирует костимулирующую сигнальную область 4-1BB, содержащую SEQ ID NO: 6, и костимулирующую сигнальную область CD27, содержащую SEQ ID NO: 7.

[0013] В некоторых вариантах осуществления, любого из вышеперечисленного или описанного в настоящем документе, выделенная нуклеиновая кислота дополнительно кодирует секретлируемый цитокин; или секретлируемый интерлейкин, содержащий общую гамма-цепь; или секретлируемый интерлейкин, содержащий общую гамма-цепь, такой как IL-15, предпочтительно при этом секретлируемый интерлейкин, содержащий общую гамма-цепь, такой как IL-15, содержит последовательность полипептида интерлейкина, функционально связанную с сигнальной последовательностью секреции (например, сигналом секреции SEQ ID NO: 33 или 49). В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует секретлируемый IL-15, предпочтительно при этом IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 34, более предпочтительно при этом IL-15 содержит последовательность 34, функционально связанную с сигнальной последовательностью секреции SEQ ID NO: 33, или при этом IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 34, функционально связанную с сигнальной последовательностью секреции SEQ ID NO: 49. В некоторых случаях секретлируемый цитокин, интерлейкин, содержащий общую гамма-цепь, и/или IL-15 кодируются на карбоксильном конце связывающей области, шарнирного и трансмембранного доменов, сигнального домена и/или костимулирующего эндодомена. В некоторых случаях

секретируемый цитокин, интерлейкин, содержащий общую гамма-цепь, и/или IL-15 кодируются на смысловой цепи 3' области, кодирующей связывающую область, шарнирные и трансмембранные домены, сигнальный домен и/или костимулирующий эндодомен.

[0014] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота кодирует мультицистронную линкерную область, сконфигурированную для облегчения трансляции CAR и секретируемого цитокина, цитокина, содержащего общую гамма-цепь, или IL-15 как отдельных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, мультицистронная линкерная область кодирует полипептидную последовательность саморасщепления и/или расщепления. В некоторых случаях последовательность саморасщепления представляет собой последовательность саморасщепления P2A, F2A, T2A или E2A. В некоторых случаях последовательность расщепления представляет собой последовательность расщепления фурином. В некоторых случаях последовательность расщепления (например, последовательность расщепления фурином) является аминоконцевой по отношению к последовательности саморасщепления. В некоторых вариантах осуществления, мультицистронная линкерная область кодирует внутренний участок посадки рибосомы. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота кодирует аминоконец мультицистронной линкерной области по отношению к сигналу секреции интерлейкина или цитокина, интерлейкина или цитокина, предпочтительно при этом мультицистронная линкерная область содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 43-45, 47 или 52-55 или их комбинацию, или кодирует внутренний участок посадки рибосомы, например, SEQ ID NO: 56 или 60.

[0015] В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен специфически связывается с CD20, и нуклеиновая кислота кодирует SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 46, 48 или 57 и 58. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержит последовательность SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 50, 51 или 59. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен специфически связывается с BCMA, и нуклеиновая кислота кодирует SEQ ID NO: 35, 36, 37 или 38. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержит последовательность SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42.

[0016] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предлагается полипептид или множество полипептидов, кодируемых любой из указанных выше выделенных нуклеиновых кислот, или как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении предлагается Т-клетка, такая как  $\gamma\delta$  Т-клетка, которая содержит любой из вышеуказанных полипептидов или множество полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка экспрессирует функциональный связывающий домен, как описано в настоящем документе, на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка секретирует цитокин, такой как интерлейкин, содержащий общую гамма-цепь, например, IL-15.

[0017] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка проявляет *in vitro* и/или *in vivo* активность относительно уничтожения гематологической опухолевой клетки, которая

демонстрирует экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА). В некоторых вариантах осуществления, активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток указанной, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки выше, чем врожденная активность *in vitro* и/или *in vivo* в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток для контрольной, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки, которая не содержит конструкцию CAR. В некоторых вариантах осуществления, например,  $\gamma\delta$  Т-клетка проявляет повышенную активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток в отношении гематологических опухолевых клеток HLA класса I<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления, активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток или повышенная активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток сохраняется в течение, в течение около, в течение по меньшей мере или в течение по меньшей мере около от 6 дней до 180 дней после первого приведения в контакт с гематологической опухолевой клеткой.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, например,  $\gamma\delta$  Т-клетка пролиферирует в ответ на приведение в контакт с гематологической опухолевой клеткой, которая демонстрирует экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА). В некоторых вариантах осуществления, например,  $\gamma\delta$  Т-клетка демонстрирует повышенную пролиферацию в ответ на приведение в контакт с гематологической опухолевой клеткой, которая демонстрирует экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА), по сравнению с контрольной, например  $\gamma\delta$  Т-клеткой, которая не экспрессирует функционально нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, на поверхности, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, например,  $\gamma\delta$  Т-клетка пролиферирует в организме-хозяине, который содержит гематологическую опухолевую клетку, которая демонстрирует экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА).

[0019] В некоторых вариантах осуществления, например, пролиферация, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки или повышенная пролиферация  $\gamma\delta$  Т-клетки сохраняется в течение, в течение около, в течение по меньшей мере или в течение по меньшей мере около от 6 дней до 180 дней после первого приведения в контакт с гематологической опухолевой клеткой. В некоторых вариантах осуществления, например,  $\gamma\delta$  Т-клетка экспрессирует провоспалительный цитокин(ы), такой как фактор некроза опухоли альфа и/или интерферон гамма, после приведения в контакт с гематологической опухолевой клеткой. В некоторых вариантах осуществления, например,  $\gamma\delta$  Т-клетка экспрессирует провоспалительный цитокин(ы), такой как фактор некроза опухоли альфа и/или гамма-интерферон, после приведения в контакт с гематологической опухолевой клеткой, в количестве, превышающем количество экспрессируемое контрольной Т-клеткой, которая не экспрессирует функционально кодируемый нуклеиновой кислотой CAR на клеточной поверхности.

[0020] В некоторых вариантах осуществления, например,  $\gamma\delta$  Т-клетка

демонстрирует сниженную, существенно сниженную, по существу сниженную, отсутствующую или полностью отсутствующую реакцию «трансплантат против хозяина» при введении в организм аллогенного хозяина по сравнению с реакцией «трансплантат против хозяина», наблюдаемой при введении  $\alpha\beta$  Т-клетки в организм аллогенного хозяина. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка представляет собой  $\gamma$  Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка представляет собой  $\delta$  Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка представляет собой  $\gamma\delta$  Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка представляет собой  $\delta 1$ ,  $\delta 2$ ,  $\delta 3$  или  $\delta 4$  Т-клетку, предпочтительно  $\delta 2$   $\delta$  Т-клетку, более предпочтительно  $\delta 1$   $\delta$  Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетка представляет собой  $\delta 1$ ,  $\delta 2$ ,  $\delta 3$  или  $\delta 4$ ,  $\gamma\delta$  Т-клетку, предпочтительно  $\delta 2$   $\gamma\delta$  Т-клетку, более предпочтительно  $\delta 1$   $\gamma\delta$  Т-клетку.

[0021] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается множество любого из вышеперечисленного, например,  $\gamma\delta$  Т-клеток или множество, например,  $\gamma\delta$  Т-клеток, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, множество включает по меньшей мере около  $10^8$ , например,  $\gamma\delta$  Т-клеток, предпочтительно от около  $10^8$ , например,  $\gamma\delta$  Т-клеток, до около  $10^{11}$ , например,  $\gamma\delta$  Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, множество включает композицию, которая содержит по меньшей мере 60%, 80% или от около 60% или 80% до около 90% или 95%  $\delta 1$ ,  $\delta 2$ ,  $\delta 3$  или  $\delta 4$   $\gamma\delta$  Т-клеток, предпочтительно  $\delta 1$  или  $\delta 2$   $\gamma\delta$  Т-клетки, более предпочтительно  $\delta 2$   $\gamma\delta$  Т-клетки, наиболее предпочтительно  $\delta 1$   $\gamma\delta$  Т-клетки.

[0022] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении предлагается способ получения, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки, как описано в настоящем документе, или множества, например,  $\gamma\delta$  Т-клеток, как описано в настоящем документе, причем способ включает трансфекцию Т-клетки(ок) с конструкцией, содержащей последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе. В некоторых случаях способ включает, например, гамма-ретровирусную трансдукцию. В некоторых случаях способ включает размножение *ex vivo* Т-клетки(ок), причем размножение *ex vivo* проводят перед трансфекцией и/или после трансфекции последовательностью выделенной нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях способ включает размножение *ex vivo* Т-клетки(ок), причем размножение *ex vivo* проводят до трансфекции и после трансфекции последовательностью выделенной нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях способ включает размножение *ex vivo* Т-клетки(ок), причем размножение *ex vivo* проводят после трансфекции последовательностью выделенной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, способ включает получение от около  $10^8$ , например,  $\gamma\delta$  Т-клеток до около  $10^{11}$ , например,  $\gamma\delta$  Т-клеток, которые функционально экспрессируют CAR, описанный в настоящем документе, в течение около 30 дней после трансфекции.

[0023] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и, например,  $\gamma\delta$  Т-клетку, описанную в настоящем документе.



[0024] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ уничтожения гематологической опухолевой клетки, причем способ включает приведение в контакт гематологической опухолевой клетки с эффективным для уничтожения опухолевых клеток количеством, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки, множества таких клеток и/или фармацевтической композиции, содержащей такие клетки, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение терапевтически эффективного количества, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) или фармацевтической композиции в организм-хозяин, содержащий гематологическую опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение в организм-хозяин, содержащий гематологическую опухолевую клетку, терапевтически эффективного количества, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) или фармацевтической композиции и одновременное или последовательное применение одного или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь.

[0025] В некоторых вариантах осуществления, применение одного или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, включает введение одновременно с введением, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) или последовательно количества цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, эффективного для увеличения пролиферации, цитотоксической активности, стойкости или их комбинация введенных, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок), предпочтительно при этом способ включает введение IL-2, более предпочтительно при этом способ включает введение IL-15. В некоторых вариантах осуществления, один или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, включают введение количества цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, эффективного для увеличения пролиферации, цитотоксической активности, устойчивости или их комбинации введенных Т-клетки(ок) до и/или после введения Т-клетки(ок). В некоторых вариантах осуществления, один или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, включают лимфодеплецию перед введением Т-клетки(ок).

[0026] В некоторых вариантах осуществления, один или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, включают секрецию одного или более цитокинов общей гамма-цепи из введенной Т-клетки(ок). В некоторых вариантах осуществления, способ снижает опухолевую нагрузку *in vivo* в организме-хозяине и/или увеличивает среднее время выживания организма-хозяина по сравнению с контрольным организмом, причем контрольному организму не вводят  $\gamma\delta$  Т-клетку(и) или фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления, способ представляет собой способ лечения онкологического заболевания у субъекта, который в этом нуждается. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении предлагается, например,  $\gamma\delta$  Т-клетка, множество, например,  $\gamma\delta$  Т-клеток или фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, для применения при лечении гематологической опухолевой клетки у субъекта, нуждающегося в этом. .

[0027] В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения онкологического заболевания путем введения терапевтически эффективного количества  $\gamma\delta$  Т-клеток, причем онкологическое заболевание включает гематологические опухолевые клетки, которые демонстрируют экспрессию CD20 на клеточной поверхности; или введение терапевтически эффективного количества  $\gamma\delta$  Т-клеток, причем онкологическое заболевание включает гематологические опухолевые клетки, которые демонстрируют экспрессию ВСМА на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, способ включает одновременное с введением  $\gamma\delta$  Т-клеток или последовательное применение одного или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь. В некоторых вариантах осуществления, способ включает выполнение множества введений  $\gamma\delta$  Т-клеток, причем интервал между множеством введений составляет по меньшей мере около недели, предпочтительно, по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 12 недель, и/или не более чем одного раза в 6 или 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция для применения в любом из вышеупомянутых способов лечения.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ

[0028] Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0029] **На Фиг. 1** представлена схематическая иллюстрация варианта осуществления, химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего один костимулирующий сигнальный эндодомен (слева) или два костимулирующих сигнальных эндодомена (справа). В контексте настоящего документа костимулирующие сигнальные эндодомены также называются костимулирующими эндодоменами или костимуляционными эндодоменами. Иллюстративные костимулирующие сигнальные эндодомены, применимые в иллюстративных CAR, включают, без ограничения, CD28; CD137 (41BB); CD278 (ICOS); CD27; CD134 (OX40); TLR2 и их комбинации.

[0030] **На Фиг. 2** проиллюстрированы последовательности связывающих доменов, которые специфически связываются с эпитопом на CD20. На Фиг. 2 представлены SEQ ID NO: 335-363, 99, 364, 107 и 365-368, соответственно, в порядке появления.

[0031] **На Фиг. 3** проиллюстрирована индукция апоптоза в CD20-экспрессирующих нормальных В-клетках нетрансдуцированными клетками V $\delta$ 1 и клетками V $\delta$ 1, трансдуцированными различными CD20-специфическими конструкциями CAR.

[0032] **На Фиг. 4** проиллюстрирована сильная цитотоксическая активность CD20-специфических CAR  $\gamma\delta$  Т-клеток относительно клеточных линий лимфомы.

[0033] **На Фиг. 5** проиллюстрирована цитотоксичность сконструированных CAR

$\gamma\delta$  Т-клеток, описанных в настоящем документе, по отношению к клеткам Raji. Вверху: Связывающие домены, содержащие CDR 3B9, 2B7, 3H7 и 9C11, тестировали в конструкции CAR, кодирующей костимулирующий эндодомен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[0034] **На Фиг. 6** проиллюстрирована цитотоксичность сконструированных CAR  $\gamma\delta$  Т-клеток, описанных в настоящем документе, по отношению к клеткам Raji. Вверху: Тестировали связывающие домены, содержащие CDR 3H7. Внизу: продемонстрирована цитотоксичность по отношению к клеткам Raji  $\gamma\delta$  Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащий связывающий домен 3H7, сигнальный домен CD3 $\zeta$  и различные костимулирующие эндодомены, как указано. CAR 3H7-CD27z имеет связывающий домен 3H7, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен CD27 и сигнальный домен CD3 $\zeta$ . 3H7-5.1 имеет связывающий домен 3H7, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[0035] **На Фиг. 7** проиллюстрированы результаты анализа цитотоксичности с повторным введением указанных  $\gamma\delta$  Т-клеток. Стрелки указывают время повторного введения.

[0036] **На Фиг. 8** проиллюстрирована *in vivo* эффективность  $\gamma\delta$  Т-клеток, описанных в настоящем документе, в мышинной модели подкожных клеток Raji NOD scid gamma (NSG).

[0037] **На Фиг. 9** проиллюстрирован подсчет внутриопухолевых CD20-специфических  $\gamma\delta$  CAR-Т-клеток *in vivo*, указывающий на увеличение *in vivo* уровня  $\gamma\delta$  CAR-Т-клеток и клиренс опухоли.

[0038] **На Фиг. 10** проиллюстрирована *in vivo* пролиферация CD20-специфических  $\gamma\delta$  CAR-Т-клеток в лимфомной опухоли CD20<sup>+</sup> и других органах.

[0039] **На Фиг. 11** проиллюстрирована *in vivo* эффективность  $\gamma\delta$  Т-клеток, описанных в настоящем документе, на мышинной модели диссеминированных клеток Raji NOD scid gamma (NSG).

[0040] **На Фиг. 12** проиллюстрировано эффективное лечение диссеминированной опухоли Raji CD20-специфическими  $\gamma\delta$  CAR-Т-клетками в мышинной модели SRG-15, которая экспрессирует IL-15 человека, без индукции реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Напротив, CD20-специфические  $\alpha\beta$  CAR-Т-клетки вызывают летальный ответ РТПХ.

[0041] **На Фиг. 13** проиллюстрирован процесс производства для получения сконструированных клеток  $\gamma\delta$  CAR-Т и несконструированных клеток  $\gamma\delta$  CAR-Т.

[0042] **На Фиг. 14** проиллюстрирована терапевтическая эффективность и устойчивость CD20 CAR V $\delta$ 1 Т-клеток, экспрессирующих sIL15, у мышей NSG с подкожно имплантированными клетками Raji, и которым повторно вводили (День 62) клетки Raji в другом месте имплантации.

[0043] **На Фиг. 15** проиллюстрирована эффективность трансдукции клеток V $\delta$ 1

указанными конструкциями scFv CAR к антигену созревания В-клеток (BCMA). BCMA также известен как член 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF17).

[0044] **На Фиг. 16** проиллюстрирована цитотоксическая активность V $\delta$ 1 Т-клеток, трансдуцированных различными конструкциями CAR к BCMA, по отношению к панели линий клеток множественной миеломы BCMA+. Клеточная линия SCABER-Luc представляет собой линию контрольных клеток, которая является BCMA-отрицательной.

[0045] **На Фиг. 17** проиллюстрирована цитотоксическая активность V $\delta$ 1 Т-клеток, трансдуцированных различными конструкциями CAR к BCMA, по отношению к панели линий клеток множественной миеломы BCMA+ лимфомы Беркитта и множественной миеломы.

[0046] **На Фиг. 18** проиллюстрирована терапевтическая эффективность *in vivo* CAR V $\delta$ 1 Т-клеток к BCMA по отношению к подкожно имплантированным клеткам NCI-H929.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Определения:

[0047] Для целей интерпретации данного описания будут применяться следующие определения, и, когда это уместно, термины, используемые в единственном числе, также будут включать множественное число и наоборот. В случае, если любое изложенное определение противоречит любому документу, включенному в настоящий документ посредством ссылки, определение, изложенное ниже, имеет преимущественную силу. Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится изобретение.

[0048] В контексте настоящего документа подразумевается, что термин «около», используемый в отношении измеряемого значения, такого как количество, временная длительность и т. п., включает вариации  $\pm 20\%$  или  $\pm 10\%$ , более предпочтительно  $\pm 5\%$ , еще более предпочтительно  $\pm 1\%$ , и еще более предпочтительно  $\pm 0,1\%$  от указанного значения, так как такие вариации являются подходящими для осуществления, раскрытых способов.

[0049] Термин « $\gamma\delta$  Т-клетки (гамма-дельта-Т-клетки)», в контексте настоящего описания, относится к подмножеству Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отдельный Т-клеточный рецептор (TCR), а именно  $\gamma\delta$ TCR, состоящий из одной  $\gamma$ -цепи и одной  $\delta$ -цепи. Термин « $\gamma\delta$  Т-клетки», в частности, включает все подмножества  $\gamma\delta$  Т-клеток, включая, без ограничения, V $\delta$ 1 и V $\delta$ 2, V $\delta$ 3,  $\gamma\delta$  Т-клетки, а также наивные, эффекторной памяти, центральной памяти и терминально дифференцированные  $\gamma\delta$  Т-клетки. В качестве дополнительного примера термин « $\gamma\delta$  Т-клетки» включает V $\delta$ 4, V $\delta$ 5, V $\delta$ 7 и V $\delta$ 8  $\gamma\delta$  Т-клетки, а также V $\gamma$ 2, V $\gamma$ 3, V $\gamma$ 5, V $\gamma$ 8, V $\gamma$ 9, V $\gamma$ 10 и V $\gamma$ 11  $\gamma\delta$  Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления  $\gamma\delta$  Т-клетки представляют собой V $\delta$ 1<sup>-</sup>, V $\delta$ 2<sup>-</sup> или V $\delta$ 1<sup>-</sup>, и V $\delta$ 2<sup>-</sup>. Композиции и способы для создания и использования

сконструированных и несконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их подтипов включают, без ограничения, те, которые описаны в США 2016/0175358; WO 2017/197347; США 9499788; США 2018/0169147; США 9907820; США 2018/0125889 и США 2017/0196910, содержание каждого из которых включено в качестве ссылки для всех целей, включая указанные композиции и способы получения и использования сконструированных и несконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их подтипов. В настоящей заявке также рассматриваются Т-клетки или другие сконструированные лейкоциты или лимфоциты, которые экспрессируют одну  $\gamma$ -цепь или одну  $\delta$ -цепь, необязательно в комбинации со вторым полипептидом, чтобы сформировать функциональный TCR. Такие сконструированные лейкоциты или лимфоциты, которые экспрессируют одну  $\gamma$ -цепь или одну  $\delta$ -цепь, могут использоваться в способах или присутствовать в описанных в настоящем документе композициях.

[0050] Используемый в настоящем документе термин «Т-лимфоцит» или «Т-клетка» относится к иммунной клетке, которая экспрессирует или экспрессировала CD3 (CD3+) и Т-клеточный рецептор (TCR+). Т-клетки играют центральную роль в клеточном иммунитете. Т-клетка, которая «экспрессировала» CD3 и TCR, была сконструирована для устранения экспрессии CD3 и/или TCR на поверхности клетки.

[0051] Используемый в настоящем документе термин «TCR» или «Т-клеточный рецептор» относится к димерному гетерологичному сигнальному белку клеточной поверхности, образующему альфа-бета или гамма-дельта рецептор, или их комбинации.  $\alpha\beta$ TCR распознают антиген, представленный молекулой МНС, тогда как  $\gamma\delta$ TCR может распознавать антиген независимо от представления МНС.

[0052] Термин «МНС» (главный комплекс гистосовместимости) относится к подмножеству генов, которые кодируют антигенпрезентирующие белки клеточной поверхности. У людей эти гены называются генами лейкоцитарного антигена человека (HLA). В настоящем документе аббревиатуры МНС или HLA взаимозаменяемы.

[0053] «Активация», в контексте настоящего документа, относится к состоянию Т-клетки, которая была достаточно стимулирована, чтобы вызвать детектируемую клеточную пролиферацию. Активация также может быть связана с индуцированной выработкой цитокинов и детектируемыми эффекторными функциями. Термин «активированные Т-клетки» относится, среди прочего, к Т-клеткам, которые подвергаются клеточному делению.

[0054] Термин «антитело», в контексте настоящего документа, относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут быть интактными иммуноглобулинами, полученными из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут быть иммунореактивными фрагментами интактных иммуноглобулинов. Антитела обычно представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Антитела по настоящему изобретению могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)<sub>2</sub>, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные

антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

[0055] Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела и относится к антигенным определяющим вариабельным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и фрагменты F<sub>v</sub>, линейные антитела, антитела scFv и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0056] Термин «тяжелая цепь антитела», в контексте настоящего документа, относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их естественных конформациях.

[0057] Термин «легкая цепь антитела», в контексте настоящего документа, относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их естественных конформациях. Легкие цепи κ и λ относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

[0058] Термин «синтетическое антитело», в контексте настоящего документа, означает антитело, которое получают с использованием технологии рекомбинантной ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом, как описано в настоящем документе. Термин также следует толковать как обозначение антитела, которое было образовано путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и какая молекула ДНК экспрессирует белок антитела, или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где ДНК или аминокислотная последовательность были получены с использованием технологии синтетической ДНК или аминокислотных последовательностей, которая доступна и хорошо известна в данной области техники.

[0059] Термин «антиген» или «Ag», в контексте настоящего документа, определяется как молекула, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может предполагать или выработку антител, или активацию специфичных иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое. Специалист в данной области техники поймет, что любая макромолекула, включая белки или пептиды, может служить антигеном. Более того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалист в данной области техники поймет, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом кодирует «антиген», как этот термин используется в настоящем документе. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Совершенно очевидно, что настоящее изобретение включает, но не ограничивается этим, применение частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях, чтобы вызвать желаемый

иммунный ответ. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген совсем не обязательно должен кодироваться «геном». Совершенно очевидно, что антиген может быть получен, синтезирован или может быть получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничивается этим, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

[0060] Термин «эпитоп» включает любую белковую детерминанту, липидную или углеводную детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, липиды или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Говорят, что антитело специфически связывается с антигеном, когда константа равновесной диссоциации ( $K_D$ ) находится в диапазоне  $10^{-6}$ - $10^{-12}$ М.

[0061] Антитела 3B9, 9C11, 3H7, 2B7 и 10F2 представляют собой иллюстративные варианты осуществления, антител, которые специфически распознают CD20. Эти антитела, их фрагменты и их определяющие комплементарность области также описаны в США 2009/0035322, где они обозначены как 3B9-10, 9C11-14, 3H7-6, 2B7-7 и 10F2-13 соответственно. Как описано в настоящем документе, данные антитела, их фрагменты и их определяющие комплементарность области полезны для создания конструкций химерного антигенного рецептора (CAR) к CD20, а также для генной инженерии и использования CAR-Т-клеток для лечения гематологических опухолей, экспрессирующих CD20.

[0062] Связывающие домены 21587N, 16747P, 16711P и 16716P представляют собой примерные варианты осуществления, связывающих доменов, которые специфически распознают ВСМА. Эти антитела, их фрагменты и их определяющие комплементарность области также описаны в патенте США 16/516028, поданном 18 июля 2019 г., содержание которого полностью и для всех целей включено посредством ссылки, в частности для связывающих доменов, антител, фрагментов антител, определяющих комплементарность областей, полипептидов, содержащих указанные определяющие комплементарность области, нуклеиновых кислот, кодирующих указанные определяющие комплементарность области, а также для специфичности эпитопа и анализов для определения специфичности эпитопов, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях 21587N, 16747P, 16711P и 16716P обозначаются как H2aM21587N, H1H16747P, H1H16711P, H1H16716P соответственно. Как описано в настоящем документе, данные антитела, их фрагменты и их определяющие комплементарность области полезны для создания конструкций химерного антигенного рецептора (CAR) к ВСМА, а также для конструирования и использования CAR-Т-клеток для лечения гематологических опухолей, экспрессирующих ВСМА.

[0063] Термин «химерные антигенные рецепторы (CAR)», в контексте настоящего документа, может относиться к искусственным Т-клеточным рецепторам, Т-тельцам,

одноцепочечным иммунорецепторам, химерным Т-клеточным рецепторам или химерным иммунорецепторам, например, и включать сконструированные рецепторы, которые прививают искусственную специфичность конкретной иммунной эффекторной клетке. CAR может быть использован для придания специфичности моноклонального антитела Т-клетке, тем самым позволяя генерировать большое количество специфических Т-клеток, например, для применения в адоптивной клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, CAR определяют специфичность клетки, например, в отношении антигена, ассоциированного с опухолью. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержат внутриклеточный домен активации (позволяющий Т-клетке активироваться при взаимодействии нацеливающего фрагмента с клеткой-мишенью, такой как опухолевая клетка-мишень), трансмембранный домен и внеклеточный домен, который может варьироваться по длине и содержит связанную с заболеванием или нарушением, *например*, область связывания опухоли с антигеном. В конкретных аспектах CAR включают слияния одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), полученных из моноклональных антител, слитых с CD3-дзета, трансмембранным доменом и эндодоменом. Специфичность других конструкций CAR может происходить от лигандов рецепторов (например, пептидов) или от рецепторов распознавания образцов, таких как дектины. В некоторых случаях расстояние между антигенраспознающими доменами может быть изменено для уменьшения клеточной смерти, индуцированной активацией. В некоторых случаях CAR содержат домены для дополнительной костимулирующей передачи сигналов, такие как CD3 $\zeta$ , FcR, CD27, CD28, CD137, DAP 10/12 и/или OX40, ICOS, TLR (*например*, TLR2) и т.д. В некоторых случаях молекулы могут коэкспрессироваться с CAR, включая костимулирующие молекулы, репортерные гены для визуализации (например, для позитронно-эмиссионной томографии), генные продукты, которые условно уничтожают Т-клетки при добавлении пролекарственного средства, хоминг-рецепторы, хемокины, рецепторы хемокинов, цитокины и рецепторы цитокинов. Кроме того, специалист в данной области техники поймет, что костимулирующий домен не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Совершенно очевидно, что настоящее изобретение включает, но не ограничивается этим, применение частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях, чтобы вызвать желаемый иммунный ответ.

[0064] Термин «противоопухолевый эффект», в контексте настоящего документа, относится к биологическому эффекту, который может проявляться в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, уменьшения количества метастаз, увеличения продолжительности жизни или облегчения различных физиологических симптомов, связанных с состоянием при онкологическом заболевании. «Противоопухолевый эффект» также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по настоящему изобретению в первую очередь предотвращать появление опухоли.



[0065] Термин «аутоантиген» означает в соответствии с настоящим изобретением любой собственный антиген, который по ошибке распознается иммунной системой как чужеродный. Аутоантигены включают, но не ограничиваются ими, клеточные белки, фосфопротеины, белки клеточной поверхности, клеточные липиды, нуклеиновые кислоты, гликопротеины, включая рецепторы клеточной поверхности.

[0066] Термин «аутогенный», в контексте настоящего документа, предназначен для обозначения любого материала, полученного от индивидуума, который позже будет повторно введен тому же индивидууму.

[0067] Термин «аллогенный», в контексте настоящего документа, относится к материалу, полученному от животного, который позже вводится другому животному того же вида.

[0068] Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству композиции, которое вызовет биологический или клинически измеряемый ответ ткани, системы или субъекта, которого добивается исследователь, ветеринар, лечащий врач или другой клиницист. Термин «терапевтически эффективное количество» включает такое количество композиции, которое при введении является достаточным для предотвращения развития или облегчения до некоторой степени одного или более признаков или симптомов поддающегося лечению расстройства или заболевания (*например*, гематологического онкологического заболевания). Терапевтически эффективное количество будет варьироваться в зависимости от композиции, заболевания и его тяжести, а также возраста, массы и т.д. субъекта, подлежащего лечению.

[0069] Термин «лечить» заболевание, в контексте настоящего документа, означает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или расстройства, испытываемого субъектом.

[0070] Введение «в комбинации с» одним или более дополнительными терапевтическими средствами включает одновременное (параллельное) и последовательное введение в любом порядке.

[0071] Термин «фармацевтически приемлемый», в контексте настоящего документа, относится к материалу, включая, но не ограничиваясь этим, соль, носитель или разбавитель, который не отменяет биологической активности или свойств соединения, и является относительно нетоксичным, т.е. материал может быть введен индивиду, не вызывая нежелательных биологических эффектов или не взаимодействуя нежелательным образом с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

[0072] «Кодирование» относится к неотъемлемому свойству специфических последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, такого как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и вытекающие из этого биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, продуцируют белок в клетке или

другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно предоставлена в перечнях последовательностей, так и не кодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут рассматриваться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

[0073] «Выделенный» означает измененное или удаленное из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом существе, не являются «выделенными», однако эта же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в естественном состоянии, будут «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в чужеродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

[0074] Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки и РНК, могут включать интроны.

[0075] Термины «пациент», «субъект», «индивидуум» и т.п. используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому животному, поддающемуся применению описанных в настоящем документе способов. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления, пациентом, субъектом или индивидуумом является человек.

[0076] Под термином «специфически связывается», в контексте данного документе по отношению к антителу, подразумевается антитело, которое распознает конкретный антиген, но по существу не распознает или не связывает другие молекулы в образце. Например, антитело, которое специфически связывается с антигеном одного вида, может также связываться с этим антигеном одного или более видов. Но такая межвидовая реактивность сама по себе не меняет классификации антитела как специфического. В другом примере антитело, которое специфически связывается с антигеном, может также связываться с различными аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная реактивность сама по себе не меняет классификации антитела как специфического. В некоторых случаях термины «специфическое связывание» или «специфично связывается» могут использоваться в отношении взаимодействия антитела, белка или пептида со вторым химическим веществом, что означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) химического вещества; например, антитело распознает и связывается с конкретной структурой белка, а не с белками в целом. Если антитело специфично к эпитопу «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободного немеченого А), в реакции, содержащей меченный «А» и антитело, снизит количество меченого А, связанного с антителом.

[0077] В некоторых вариантах осуществления, специфическое связывание может

характеризоваться константой равновесной диссоциации, составляющей по меньшей мере около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее (*например*, меньшая  $K_D$  означает более прочное связывание). Способы определения, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с первым антигеном и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифическое антитело, которое связывается с двумя разными областями антигена, тем не менее, считаются антителами, которые «специфически связываются» в контексте настоящего описания.

[0078] Гематологическое онкологическое заболевание представляет собой онкологическое заболевание, происходящее из крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) онкологических заболеваний включают лейкозы, включая острые лейкозы (такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз), хронические лейкозы (такой как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (вялотекущую и тяжелую форму), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию. В предпочтительном варианте осуществления, гематологическое онкологическое заболевание экспрессирует или сверхэкспрессирует CD20. В предпочтительном варианте осуществления, гематологическое онкологическое заболевание экспрессирует или сверхэкспрессирует антиген созревания В-клеток (BCMA), также известный как член 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF17).

[0079] «Кассета экспрессии» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеиновой кислотой, кодирующей транскрипт или полипептид, который должен быть экспрессирован. Кассета экспрессии содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Кассеты экспрессии могут быть компонентом вектора, такого как космида, плаزمиды (например, голая или содержащаяся в липосоме) или вирус (например, лентивирус, ретровирус, аденовирус и аденоассоциированный вирус). Кассета экспрессии может находиться в клетке-хозяине, такой как  $\gamma\delta$  Т-клетка.

[0080] Диапазоны: по всему тексту этого описания различные аспекты настоящего изобретения могут быть представлены в виде диапазонов. Следует понимать, что описание в виде диапазонов предоставляется исключительно для удобства и краткости, и его не следует воспринимать как негибкое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне.

Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрывающие поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применимо независимо от широты диапазона.

**Конструкции химерного антигенного рецептора:**

[0081] Аспекты настоящего изобретения включают нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, а также конструкции и векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты. В некоторых случаях нуклеиновая кислота является, например, гетерологичным компонентом кассеты экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой, например, гетерологичный компонент ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой, например, гетерологичный компонент  $\alpha\beta$  или  $\gamma\delta$  Т-клетки, и предпочтительно  $\gamma\delta$  Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой, например, гетерологичный компонент  $\gamma^+$  Т-клетки и/или  $\delta^+$  Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой, например, гетерологичный компонент  $\alpha^-$  Т-клетки и/или  $\beta^-$  Т-клетки.

[0082] В настоящем документе описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие связывающий домен CAR, который специфически связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью (ТАА), экспрессируемым на поверхности гематологической опухолевой клетки. Примеры ТАА включают CD19, CD20 и ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен представляет собой связывающий CD19 домен, такой как связывающий CD19 домен, описанный в патенте США № 9540445, содержание которого включено в качестве ссылки во всей полноте и для всех целей и, в частности, для связывающих доменов, антител, фрагментов антител, определяющих комплементарность областей, полипептидов, содержащих указанные определяющие комплементарность области, нуклеиновых кислот, кодирующих указанные определяющие комплементарность области, а также специфичности эпитопа и анализов для определения специфичности эпитопа, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен представляет собой связывающий CD20 домен, такой как связывающий CD20 домен, описанный в заявке на патент США № 2009/0035322, содержание которого включено в качестве ссылки полностью и для всех целей и, в частности, для связывающих доменов, антител, фрагментов антител, определяющих комплементарность областей, полипептидов, содержащих указанные определяющие комплементарность области, нуклеиновых кислот, кодирующих указанные определяющие комплементарность области, и специфичностей эпитопа и анализов для определения специфичности эпитопа, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен представляет собой связывающий ВСМА домен, такой как связывающий ВСМА домен, описанный в WO 2018/133877, или связывающий ВСМА домен, описанный в патенте США 16/516028, поданном 18 июля 2019 г., содержимое каждого из которых включено в качестве ссылки полностью и для

всех целей и, в частности, для связывающих доменов, антител, фрагментов антител, определяющих комплементарность областей, полипептидов, содержащих указанные определяющие комплементарность области, нуклеиновых кислот, кодирующих указанные определяющие комплементарность области, и специфичностей эпитопа и анализов для определения специфичности эпитопа, описанных в настоящем документе. Обычно область, кодирующая связывающий домен, находится в 5' линкерной области (*например*, области, кодирующей шарнирный домен CD8 $\alpha$ ).

[0083] В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен связывает антиген, экспрессируемый в полноразмерном функциональном полипептиде на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен связывает антиген, представленный в комплексе МНС:антиген. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен связывает антиген ограниченным НЛА образом. Связывающие домены, проявляющие специфичность для комплексов МНС:антиген, описаны, *например*, в WO/2016/199140 и WO/2016/199141, содержание каждого из которых включено в качестве ссылки полностью и для всех целей и, в частности, для связывающих доменов, антител, фрагментов антител, определяющих комплементарность областей, полипептидов, содержащих указанные определяющие комплементарность области, нуклеиновых кислот, кодирующих указанные определяющие комплементарность области, и специфичностей эпитопа и анализов для определения специфичности эпитопа, описанных в настоящем документе.

[0084] Примеры связывающих CD20 доменов включают, но не ограничиваются ими, связывающие домены, которые селективно связываются с эпитопом в пределах CD20, связанным антителом к CD20, или конкурирует за связывание с 3B9, 3H7, 2B7, 9C11 или 10F2; или 3B9, 3H7, 2B7 или 9C11; или 3H7. Дополнительно или альтернативно, связывающий CD20 домен может включать определяющие комплементарность области антитела к CD20, выбранного из группы, состоящей из 3B9, 3H7, 2B7, 9C11 и 10F2; выбранного из группы, состоящей из 3B9, 3H7, 2B7 и 9C11; или содержат определяющие комплементарность области антитела к CD20, выбранные из группы, состоящей из 3H7. В настоящем раскрытии также рассматриваются связывающие CD20, CD19 и ВСМА домены, которые конкурируют за связывание с последовательностью, представленной в настоящем документе.

[0085] С помощью известных способов можно определить, связывается ли связывающий CD20 домен с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или связывающий домен, или конкурирует за связывание с ним. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонный связывающий домен, могут наблюдать за связыванием эталонного связывающего домена с CD20 в условиях насыщения. Затем может быть оценена способность испытуемого связывающего домена связываться с молекулой CD20. Если испытуемый связывающий домен способен связываться с CD20 после насыщения связывания со эталонным связывающим доменом, можно сделать вывод, что испытуемый связывающий домен связывается с эпитопом,

отличным от того, с которым связывается эталонный связывающий домен. С другой стороны, если испытуемый связывающий домен не способен связываться с CD20 после насыщения связывания с эталонным связывающим доменом, то испытуемый связывающий домен может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с эталонным связывающим доменом.

[0086] Для того, чтобы определить, конкурирует ли связывающий домен за связывание с эталонным связывающим доменом, описанный выше способ связывания выполняется в двух направлениях: в первой ориентации эталонному связывающему домену позволяют связываться с CD20 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания испытуемого связывающего домена с молекулой CD20. Во второй ориентации проводят эксперимент по связыванию испытуемого связывающего домена с молекулой CD20 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного связывающего домена с молекулой CD20. Если в обеих ориентациях только первый (насыщающий) связывающий домен способен связываться с молекулой CD20, то делается вывод, что испытуемый связывающий домен и эталонный связывающий домен конкурируют за связывание с CD20. Как будет понятно специалисту в данной области техники, связывающий домен, который конкурирует за связывание с эталонным связывающим доменом, не обязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонный связывающий домен, но может стерически блокировать связывание эталонного связывающего домена путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа. Описанные выше способы для определения конкуренции и связывания эпитопа со связывающим CD20 доменом аналогичным образом могут быть применены к связывающим CD19 доменам и связывающим ВСМА доменам.

[0087] Два связывающих домена связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждый из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного связывающего домена ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, например, 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., *например*, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два связывающих домена имеют один и тот же эпитоп, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного связывающего домена, уменьшают или устраняют связывание другого. Два связывающих домена имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного связывающего домена, уменьшают или устраняют связывание другого.

[0088] Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (*например*, анализ мутации пептидов и связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания испытуемого связывающего домена связано со связыванием с тем же эпитопом, что и для эталонного связывающего домена, или пространственное блокирование (или другое явление) является причиной отсутствия

наблюдаемого связывания. Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ИФА, РИА, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания, доступного в данной области техники.

[0089] В настоящем описании представлены антитела и CAR, имеющие «существенную идентичность» или «существенное сходство» с последовательностями, представленными в настоящем документе в CDR или каркасных областях. Термин «существенная идентичность» или «практически идентичный», когда относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной цепью другой нуклеиновой кислоты) существует идентичность нуклеотидной последовательности в %, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или практически аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый молекулой эталонной нуклеиновой кислоты.

[0090] Применительно к полипептидам термин «существенное сходство» или «в значительной степени подобный» означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, программами GAP или BESTFIT с использованием штрафа за делецию по умолчанию, разделяют по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% идентичности последовательностей. В некоторых аспектах положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные

свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства могут быть увеличены для корректировки консервативного характера замены. Средства для выполнения этой коррекции хорошо известны специалистам в данной области техники. См. *например*, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, который включен в данный документ в качестве ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) боковые цепи, содержащие амид: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытое в публикации Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, которая включена в данный документ в качестве ссылки. «Умеренно консервативное» замещение представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0091] Идентичность и/или сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности, используя меры сходства, относящиеся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., *например*, GCG версии 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнивать с использованием FASTA с рекомендованными параметрами или по умолчанию; программа в GCG версии 6.1. FASTA (*например*, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между запросной и поисковой последовательностями (Pearson (2000) *выше*). Последовательности также можно сравнивать с использованием алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана с использованием аффинного поиска по разрыву со штрафом за открытие гэпа, равным 12, и штрафом за продление гэпа, равным 2, матрицы BLOSUM 62. Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении раскрытой в настоящем документе последовательности с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов,



является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См, *например*, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 and (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[0092] В настоящем документе представлены CAR к CD20, к BCMA или к CD19, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем документе, имеющие одну или более замен (например, консервативные замены). Например, настоящее раскрытие включает CAR к CD20, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, *например*, с 20 или меньше, 19 или меньше, 18 или меньше, 17 или меньше, 16 или меньше, 15 или меньше, 14 или меньше, 13 или меньше, 12 или меньше, 11 или меньше, 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше, или 1 аминокислотной заменой относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR (например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3), раскрытых в настоящем документе. Например, CAR к CD20 может содержать 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену (например, консервативные аминокислотные замены) относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR (например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3), описанных в настоящем документе.

[0093] Точно так же настоящее раскрытие включает CAR к BCMA, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, *например*, с 20 или меньше, 19 или меньше, 18 или меньше, 17 или меньше, 16 или меньше, 15 или меньше, 14 или меньше, 13 или меньше, 12 или меньше, 11 или меньше, 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или меньше или 1 аминокислотной заменой по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR (например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3), раскрытых в настоящем документе. Например, CAR к BCMA может содержать 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену (например, консервативную аминокислотную замену) относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR (например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3), раскрытых в настоящем документе.

[0094] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий CD20 домен, имеющий определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (HCDR3), и CDR3 легкой цепи (LCDR3), причем HCDR3 и LCDR3 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:345 (AKDPSYSGSGSYHSYYGMDV) и 353 (QQRFNWPLT); 201 (VKDFHYGSGSNYGMDV) и 209 (QQSNDWPLT); и 249 (TKDGSYGHFYSGLDV) и 257 (QQRYYWPLT).

[0095] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота

кодирует связывающий CD20 домен, имеющий последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) и последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), причем последовательности HCVR и LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 339 (EEQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFHDYTMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSLGYADSVKGRFTISRDNAAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDPSYSGSYHSYYGMDVWGQGTTVTVSS) и 347 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCWASQISRYLVWYQQKCGQAPRLLIYEASKRATGIPVRFSGSGSGTDFTLTISSESEDFAVYYCQQRFNWPLTFGGGTKVEIK); 195 (EVQLAESGGDLVQSGRSLRLSCAASGITFHDYAMHWVRQPPGKGLEWVSGISWNSDYIGYADSVKGRFTISRDNAAKNSLYLQMNSLRPDDTALYYCVKDFHYGSGSNYGMVWGQGTTVTVSP) и 203 (EIVMTQSPATLSMSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKVGQAPRLLISGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQSNDWPLTFGQGTRLEIK); и 243 (EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSDTIGYADSVKGRFTISRDNAAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCTKDGSYGHFYSGLDVWGQGTTVTVSS) и 251 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYVASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEDFAVYYCQQRYYWPLTFGGGTKVEIK).

[0096] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий CD20 домен, имеющий домен определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (HCDR3), и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), при этом домен HCDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, где X1=A, V или T; X2=K; X3=D; X4=P, F или G; X5=S или H; X6=Y; X7=G; X8=S или H; X9=G или F; X10=S или Y; X11=Y, N или S; X12=Y, G или H; X13=G, L или S; X14=Y, M или D; X15=Y, D или V; X16 =G, V или отсутствует; X17=M или отсутствует; X18=D или отсутствует; X19=V или отсутствует (SEQ ID NO: 369); и домен LCDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9, где X1=Q; X2=Q; X3=R или S; X4=N, Y или F; X5=N, D, или Y; X6=W; X7=P; X8=L; X9=T (SEQ ID NO: 370).

[0097] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий CD20 домен, имеющий последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) и последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), причем последовательности HCVR и LCVR представляют собой SEQ ID NO: 99 (EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDNSYGKFYYGLDVWGQGTTVTVSS) и 107 (EIVMTQSPATLSVSPGERTTLSCRASQSVSSNLAWYLQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPITFGQGTRLEIK).

[0098] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий CD20 домен, который связывает тот же эпитоп, что и, конкурирует с, или представляет собой связывающий CD20 домен, имеющий определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), и определяющие

комплементарность области легкой цепи (LCDR), причем последовательности HCDR и LCDR представляют собой последовательности HCDR из SEQ ID NO: 99 и последовательности LCDR из SEQ ID NO: 107 соответственно.

[0099] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий CD20 домен, который связывает тот же эпитоп, что и, конкурирует с, или представляет собой связывающий CD20 домен, имеющий HCDR1, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 101 (GFTFYDYA), HCDR2, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 103 (ISWNSGYI), и/или HCDR3, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 105 (AKDNSYGKFFYYGLDV). В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий CD20 домен, который связывает тот же эпитоп, что и, конкурирует с, или представляет собой связывающий домен к CD20, имеющий LCDR1, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 109 (QSVSSN), LCDR2, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 111 (GAS), и/или LCDR3, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 113 (QQYNNWPIT). В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий CD20 домен, который связывает тот же эпитоп, что и, конкурирует с, или представляет собой связывающий CD20 домен, имеющий HCDR1, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO:101, HCDR2, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO:103, HCDR3, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 105, LCDR1, которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 109, LCDR2 которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 111 и LCDR3 которая представляет собой или содержит SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий CD20 домен, имеющий HCDR1, содержащую SEQ ID NO:101, HCDR2, содержащую SEQ ID NO:103, HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 105, LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 109, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 111 и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 113.

[00100] Примеры связывающих доменов ВСМА включают, но не ограничиваются ими, связывающие домены, которые избирательно связываются с эпитопом в пределах ВСМА, связанным антителом к ВСМА, или конкурирует за связывание со связывающим ВСМА доменом, описанным в WO 2018/133877, или связывающим ВСМА доменом, описанным в США 16/516028, поданным 18 июля 2019 г. Дополнительно или альтернативно, связывающий ВСМА домен может включать определяющие комплементарность области антитела к ВСМА, выбранного из группы, состоящей из антитела к ВСМА или химерного антигенного рецептора, описанного в WO 2018/133877, и антитела к ВСМА или химерного антигенного рецептора, описанного в США 16/516028, поданного 18 июля 2019 г.

[00101] Примеры связывающих ВСМА доменов включают, но не ограничиваются ими, связывающие домены, которые селективно связываются с эпитопом в пределах ВСМА, связанного с или конкурирующего за связывание с CAR 16716P к ВСМА, CAR 16747P к ВСМА и/или CAR 21587N к ВСМА. Дополнительно или альтернативно,

связывающий ВСМА домен может содержать определяющие комплементарность области для CAR к ВСМА, выбранного из группы, состоящей из CAR 16716P к ВСМА, CAR 16747P к ВСМА и CAR 21587N к ВСМА.

[00102] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий ВСМА домен, имеющий определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (HCDR3), и CDR3 легкой цепи (LCDR3), где HCDR3 и LCDR3 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:21 (RAGDNWNWFDP) и SEQ ID NO:22 (QQAQKSVFPT); SEQ ID NO:23 (EGGNYGMDV) и SEQ ID NO:24 (QQANSFPPT); и SEQ ID NO:25 (FAEYCGGNICYYYGMDV) и SEQ ID NO:26 (QQCGGSPWT).

[00103] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий ВСМА домен, имеющий последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) и последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), где последовательности HCVR и LCVR выбраны из группы, состоящей из HCVR связывающего домена 16716P SEQ ID NO: 27 (MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWV RQAPGKGLEWVSAIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKRAGDNWNWFDPWGQGLVTV) и LCVR связывающего домена 16716P SEQ ID NO: 28

(DIQMTQSPSSVSASLGDRVTITCRASQGISSWLAWYQRKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGADFTLTISLQPEDFATYYCQQAQKSVFPTFGPGTKVDIK); HCVR связывающего домена 16747P SEQ ID NO: 29

(MSVPTQVLGLLLLWLTDARCQVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSDYYISWIRQAPGKGLEWVSYISSGSSIKYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGNYGMDVWGQGTITVTV) и LCVR связывающего домена 16747P SEQ ID NO: 30

(DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGINNW LVWYQQKPGKAPKLLIYAATSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPPTFGQGTKLEIK); и HCVR связывающего домена 21587N SEQ ID NO: 31 (MSVPTQVLGLLLLWLTDARCQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINYYYWNWIR QPPGKGLEWIGYISYSGNTNYNPSLKSRTISVATSRNQFSLTSSVTAADTAVYYCARF AYEYCGGNICYYYGMDVWGQGTITVTV) и LCVR связывающего домена 21587N SEQ ID NO:32

(EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRASQSVGSSFLAWYQQKPGQAPRRLMYGASNRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQCGGSPWTFGQGTKVEIK).

[00104] В настоящем документе предложены CAR к ВСМА, содержащие варианты любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или более замен (например, консервативных замен). Например, настоящее описание включает CAR к ВСМА, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, *например*, с 20 или менее, 19 или менее, 18 или менее, 17 или менее, 16 или менее, 15 или менее, 14 или менее, 13

или менее, 12 или менее, 11 или менее, 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, 2 или менее, или 1 аминокислотной заменой относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR (например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3), раскрытых в настоящем документе. Например, CAR к ВСМА может содержать 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену (например, консервативную аминокислотную замену) относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR (например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3), раскрытых в настоящем документе.

[00105] Типичные связывающие домены, описанные в настоящем документе, обычно включают, в порядке от amino- до карбоксильного конца, область тяжелой цепи, за которой следует область легкой цепи (VH-VL). Если определенный порядок областей VH и VL в связывающем домене описан явно или неявно, следует понимать, что настоящий документ описывает альтернативный вариант осуществления, в котором порядок областей VH и VL меняется на противоположный, например, в scFv или CAR, содержащем scFv-связывающий домен. Таким образом, описание порядка VH-VL также описывает альтернативный порядок VL-VH, например, в scFv или CAR, содержащем scFv-связывающий домен. Кроме того, описание порядка VL-VH также описывает альтернативный порядок VH-VL, например, в scFv или CAR, содержащем scFv-связывающий домен.

[00106] Обычно описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, включают внеклеточную линкерную часть, которая кодирует пептидный линкер, который связывает связывающий домен с трансмембранным доменом. Типичные линкерные части включают, без ограничения, линкерную часть, которая кодирует шарнирный домен CD8 $\alpha$ , *например*, SEQ ID NO: 1 (PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY) или SEQ ID NO: 2 (TTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY). Как правило, область, кодирующая пептидный линкер (*например*, шарнирный домен CD8 $\alpha$ ) представляет собой 3' область, кодирующую связывающий домен, и 5' область, кодирующую трансмембранный домен.

[00107] Описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, включают трансмембранный домен. Трансмембранный домен может связываться с внеклеточным антигенсвязывающим доменом, *например*, и шарнирный домен с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами. Например, трансмембранный домен может связываться антигенсвязывающим доменом, *например*, и шарнирный домен с сигнальным доменом CD3 $\zeta$  и, необязательно, с одним или двумя костимулирующими эндодоменами. Примеры трансмембранных доменов включают, без ограничения, трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , *например*, SEQ ID NO:3 (IWAPLAGTTCGVLVLLSLVITLYC). Обычно область, кодирующая трансмембранный домен (*например*, трансмембранный домен CD8 $\alpha$ ), представляет собой 3' область,

кодирующую пептидный линкер (*например*, шарнирный домен CD8 $\alpha$ ) и 5' область кодирующую один или более цитоплазматических доменов.

[00108] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует цитоплазматическую область, содержащую один или более цитоплазматических доменов. Область, кодирующая цитоплазматическую область, обычно представляет собой 3' область, кодирующую трансмембранный домен. Цитоплазматические домены обычно представляют собой сигнальные домены, которые обеспечивают активирующий сигнал для пролиферации  $\gamma\delta$  Т-клеток, цитотоксической активности и/или экспрессии провоспалительных цитокинов (*например*, TNF- $\alpha$  или IFN $\gamma$ ). Примером цитоплазматического домена является сигнальный домен CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен CD3 $\zeta$  представляет собой или содержит SEQ ID NO:4 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDRRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR). В некоторых вариантах осуществления, сигнальный домен CD3 $\zeta$  представляет собой или содержит SEQ ID NO:5 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLY QGLSTATKDTYDALHMALPPR). В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая область содержит несколько (*например*, 2, 3, 4, 5 или 6) сигнальных доменов, таких как несколько (*например*, 2, 3, 4, 5 или 6) сигнальных доменов CD3 $\zeta$  *например*, каждый независимо выбранный из SEQ ID NO: 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая область содержит несколько (*например*, 2, 3, 4, 5 или 6) не-CD3 $\zeta$  сигнальных доменов и сигнальный домен CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая область содержит не-CD3 $\zeta$  сигнальный домен и несколько (*например*, 2, 3, 4, 5 или 6) сигнальных доменов CD3 $\zeta$ .

[00109] Цитоплазматическая область может содержать один или более костимулирующих эндодоменов. Область, кодирующая один или более костимулирующих эндодоменов, может представлять собой 5' или 3' области, кодирующие сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, область, кодирующая один или более костимулирующих эндодоменов, представляет собой 5' область, кодирующую сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, область, кодирующая один или более костимулирующих эндодоменов, представляет собой 5' область сигнального домена, а дополнительная область, кодирующая один или более костимулирующих эндодоменов, представляет собой 3' область сигнального домена. Примеры костимулирующих эндодоменов включают, без ограничения, CD28; CD137 (4-1BB); CD278 (ICOS); CD27; CD134 (OX40); Dap10; Dap12; DNAm-1; 2B4; домен SLAM; и TLR2 костимулирующие эндодомены и их комбинации.

[00110] В некоторых вариантах осуществления, конструкция кодирует по меньшей мере один костимулирующий эндодомен 4-1BB и, необязательно, второй костимулирующий эндодомен, выбранный из костимулирующего эндодомена 4-1BB, 2B4,

ICOS, CD28 и CD27. В некоторых вариантах осуществления, конструкция кодирует по меньшей мере два костимулирующих эндодомена 4-1BB или два костимулирующих эндодомена 4-1BB в комбинации с одним, двумя, тремя или четырьмя или более костимулирующими эндодоменами, выбранными из 4-1BB, ICOS, CD28 и CD27. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующий эндодомен 4-1BB содержит SEQ ID NO:6 (KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL).

[00111] В некоторых вариантах осуществления, конструкция кодирует один костимулирующий эндодомен CD27 и, необязательно, второй костимулирующий эндодомен, выбранный из костимулирующего эндодомена 4-1BB, ICOS, CD28 и CD27. В некоторых вариантах осуществления, конструкция кодирует костимулирующий эндодомен CD27 и костимулирующий эндодомен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления, конструкция кодирует два костимулирующих эндодомена CD27. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующий эндодомен CD27 содержит SEQ ID NO:7 (QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQED YRKPEPACSP).

[00112] В некоторых вариантах осуществления, конструкция кодирует сигнал секреции, например, SEQ ID NO: 33 (MALPVTALLLPLALLLHAARP), функционально связанный для облегчения секреции С-концевого полипептида, такого как цитокин, который поддерживает активацию, цитотоксичность и/или устойчивость Т-клетки (например, CAR-Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, конструкция кодирует сигнал секреции, например, SEQ ID NO: 33, функционально связанный для облегчения секреции цитокина, содержащего общую гамма-цепь, такого как IL-15, или его активного фрагмента, например, SEQ ID NO: 34 (NWNVISDLKKIED LIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSS NGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS). Примеры цитокинов, содержащих общую гамма-цепь, включают IL-2 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления, цитокин, содержащий общую гамма-цепь, выбран из IL-2, IL-7 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления, цитокин, содержащий общую гамма-цепь, представляет собой IL-15. Последовательности IL-15, включая последовательности нуклеиновых кислот с оптимизированными кодонами, кодирующие sIL15, раскрыты в настоящем документе и в WO 2007/037780.

[00113] В некоторых вариантах осуществления, конструкция кодирует одну или более мультицистронных линкерных областей, например, между сигнальным доменом и/или костимулирующим эндодоменом и сигналом секреции, функционально связанным для облегчения секреции цитокина. Мультицистронная линкерная область представляет собой область полипептидной последовательности или последовательности РНК, которая способствует продукции множества дискретных полипептидов из одного продукта транскрипции. В некоторых вариантах осуществления, мультицистронная линкерная область кодирует последовательность расщепления. Подходящие последовательности расщепления включают последовательности саморасщепления, такие как последовательность расщепления P2A, F2A, E2A или T2A и/или последовательности,

которые расщепляются эндогенной протеазой, такой как фурин.

[00114] В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой последовательность расщепления P2A. В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой последовательность расщепления фурином. В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой P2A и последовательность расщепления фурином. В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой последовательность расщепления P2A SEQ ID NO: 43 (SGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP). В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой последовательность расщепления фурином SEQ ID NO: 44 (RAKR). В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой P2A+последовательность расщепления фурином SEQ ID NO: 45 (RAKRSGSGATNFSLLKQAG DVEENPGP).

[00115] В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой или содержит последовательность расщепления P2A SEQ ID NO: 52 (ATNFSLLKQAGDVEENPGP). В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой или содержит последовательность расщепления F2A SEQ ID NO: 53 (VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой или содержит последовательность расщепления E2A SEQ ID NO: 54 (QCTNYALLKLAGDVESNPGP). В некоторых вариантах осуществления, последовательность расщепления представляет собой последовательность расщепления T2A SEQ ID NO: 55 (EGRSLLTCGDVEENPGP). В некоторых аспектах множественные последовательности саморасщепления могут быть закодированы на карбокси-конце сигнального и/или костимулирующего домена и на аминоконце кодируемого секретируемого цитокина (например, цитокина, содержащего общую гамма-цепь, такого как IL-15), предпочтительно, в которых множественные последовательности саморасщепления независимо выбраны из группы, состоящей из последовательности расщепления P2A, последовательности расщепления T2A, последовательности расщепления E2A и последовательности расщепления F2A. В некоторых аспектах одна или более последовательностей саморасщепления и одна или более последовательностей, расщепляемых эндогенной протеазой, кодируются в конструкции, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, сайт узнавания эндогенной протеазой кодируется на аминоконце последовательности саморасщепления.

[00116] В некоторых вариантах осуществления, мультицистронная линкерная область кодирует внутренний участок посадки рибосомы. Примерный внутренний участок посадки рибосомы кодируется SEQ ID NO: 56 (СТААСГТТАСТГГССГААССГСТТГГААТААССГСТТГТГСГТТТГТСТАТАТГТ ТАТТТТССАССАТАТТГССГТСТТТТГГСААТГТГАССГССГГААССТГГСССТГ ТСТТСТТГАСГАССАТТССТАССГСТТТССССТСТСГССААССААТГСААССГТ



TGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGT  
 CTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCG  
 GCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCAC  
 GTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC  
 AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCC  
 TCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTAAAAAACGTCTAGGCCCCC  
 GAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATA).

[00117] Другой примерный внутренний участок посадки рибосомы кодируется SEQ  
 ID NO: 60

(AGCAGGTTTCCCAACTGACACAAAACGTGCAACTTGAAACTCCGCCTGGTCTTTC  
 CAGGTCTAGAGGGGTAACACTTTGTACTGCGTTTGGCTCCACGCTCGATCCACTGGC  
 GAGTGTTAGTAACAGCACTGTTGCTTCGTAGCGGAGCATGACGGCCGTGGGAACTC  
 CTCCTTGGTAACAAGGACCCACGGGGCCAAAAGCCACGCCCACACGGGCCCCGTCAT  
 GTGTGCAACCCACAGCACGGCGACTTTACTGCGAAACCCACTTTAAAGTGACATTGAA  
 ACTGGTACCCACACACTGGTGACAGGCTAAGGATGCCCTTCAGGTACCCCGAGGTA  
 ACACGCGACACTCGGGATCTGAGAAGGGGACTGGGGCTTCTATAAAAGCGCTCGGT  
 TAAAAAGCTTCTATGCCTGAATAGGTGACCGGAGGTCGGCACCTTTCCTTTGCAAT  
 TACTGACCAC).

[00118] Другие подходящие внутренние участки посадки рибосомы включают, но не ограничиваются ими, участки, описанные в Nucleic Acids Res. 2010 Jan;38(Database issue):D131-6. doi: 10.1093/nar/gkp981. Epub 2009 Nov 16, описанные на iresite.org, описанные в WO 2018/215787, последовательность, описанную в GenBank, номер доступа KP019382.1, и элемент IRES, описанный в GenBank, номер доступа LT727339.1.

[00119] Дополнительные мультицистронные линкерные области, включая саморасщепляющиеся последовательности и элементы IRES, раскрыты в США 2018/0360992 и США 8865467.

[00120] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует

SEQ ID NO:8  
 (MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEIVMTQSPATLSVSPGERTTLSCRASQSVSSNLAWYLQ  
 KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPITFG  
 QGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMH  
 WVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL  
 YYCAKDNSYGKFYYGLDVWGQGTIVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  
 AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQRRKYRSNKGESPVEPAEPC  
 HYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
 DVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  
 GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR), полипептид 3H7 - CD8 - CD27z, содержащий следующие домены в следующем порядке: связывающий домен 3H7, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен CD27 и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[00121] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует

SEQ	ID	NO:9
(MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGTSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFNDYAMH WVRQAPGKGLEWVSVISWNSDSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMHSRAEDTAL YYCAKDNHYGSGSYYYYQYGMDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPGMPGKPKRRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR),	полипептид 3B9-CD8-BBz,	содержащий следующие домены в следующем порядке: связывающий домен 3B9, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[00122] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует

SEQ	ID	NO:10
(MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEIVMTQSPATLSVSPGERTTLSCRASQSVSSNLAWYQL KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPITFG QGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMH WVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDNSYGKFYYGLDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPGMPGKPKRRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR),	полипептид 3H7-CD8-BBz,	содержащий следующие домены в следующем порядке: связывающий домен 3H7, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[00123] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует

SEQ	ID	NO:11
(MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEIVLTQSPATLSLSPGERAALSCRASQSVSNYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYCQQRSNWPLTFG GGTKVEIRGGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFRDYTMH WVRQGPQKGLEWVSGISWNSDYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTAL YYCAKLSGTYRDYFYGVVDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPGMPGKPKRRKPNQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR),	полипептид 2B7-CD8-BBz,	содержащий следующие домены в следующем порядке: связывающий домен 2B7, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[00124] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует SEQ ID NO:12 (MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRTSQTTSYLAWYRQK PGQAPRLLIYDASNRAAGIPARFSGSGSGTDFTLTINSLEPEDFAVYYCQLRTNWITFGQG TRLEIKGGGGSGGGGSGGGGQVQLVESGGDSVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSYMTWIR QAPGKGLEWVSFISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNVKKSLYLQMNRLRAEDTAVYYCA REEPGNYVYYGMDVWGQGTTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR), полипептид 9C11-CD8-BBz, содержащий следующие домены в следующем порядке: связывающий домен 9C11, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[00125] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует SEQ ID NO: 20 (MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEIVMTQSPATLSVSPGERTTTLSCRASQSVSSNLAWYLQKPGQAPRLLIYGAST RATGIPARFSGSGSGTEFILTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPIT FGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSL RLSCAASGFTFYDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDNSY GKFFYYGLDVWGQGTTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPENGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR), полипептид 3H7-CD3z, содержащий следующие домены в следующем порядке: связывающий домен 3H7, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$  и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[00126] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид 3H7-CD8-27z, содержит последовательность SEQ ID NO:13 (ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAG ATGCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA GAACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACC TTCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA CTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACT GGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGAGATTAAGGTGGAGGTGGATCT GGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAG GCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT TTTATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGG GTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGC

CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGT  
 CTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGGAAA  
 GTTCTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAC  
 CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCC  
 TGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGG  
 GGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGG  
 GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCCAACGACGCAAGTACCGTCCA  
 AATAAGGAGAGTCACCAGTAGAACCCGCCGAACCTTGTCACTATTCATGTCCACGC  
 GAAGAGGAGGGTTCAACGATCCCTATTCAGGAAGATTACAGAAAGCCGGAACCTGC  
 TTGTAGCCCCAGAGTGAAGTTCAGCCGCAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGG  
 GCCAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGCGGGAGGAATACGACGTG  
 CTGGACAAGCGCAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCCAGAGGCGGA  
 AGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGC  
 CTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGCGACGCGGCAAGGGCCACGACGGC  
 CTGTACCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCA  
 GGCCCTGCCTCCCCGTTAG).

[00127] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид 3H7-CD8-BBz, содержит последовательность SEQ ID NO:14 (ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAG  
 ATGCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA  
 GAACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACC  
 TTCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA  
 CTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTCACCA  
 TCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACT  
 GGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGAGATTAAGGTGGAGGTGGATCT  
 GGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAG  
 GCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT  
 TTTATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGG  
 GTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGC  
 CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGT  
 CTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGGAAA  
 GTTCTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAC  
 CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCC  
 TGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGG  
 GGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGG  
 GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTC  
 CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGA  
 TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGA  
 AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT  
 AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG

CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC  
 CTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT  
 GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA  
 CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA).

[00128] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид 3B9-CD8-BBz, содержит последовательность SEQ ID NO:15 (ATGAGCGTTCCAACCCAAGTTCTGGGACTGCTTCTGCTCTGGTTGACTGACGCTAGG  
 TGCGAAATAGTAATGACCCAATCCCCAGCCACTCTCTCCGTTAGCCCAGGTGAAAGA  
 GCCACTCTTAGTTGCAGGGCTAGTCAATCCGTATCTAGCAACCTGGCCTGGTACCAG  
 CAAAAGCCCGGACAAGCGCCGCGGTTGTTGATCTATGGGACGAGCACACGAGCTAC  
 GGGTATTCGGCCAGGTTCTCAGGGTCTGGCTCCGGAACCGAATTTACATTGACGAT  
 CAGTAGTCTGCAATCAGAGGATTTCCGCGTTTACTATTGCCAACAGTACAATAATTG  
 GCCGCTCACATTCGGGGGAGGAACCAAGGTCGAGATTAAGGGAGGTGGGGGTAGTG  
 GGGGCGGGGGGTGAGGAGGTGGAGGAGAGGTACAGTTGGTAGAAAGCGGCGGGGG  
 GTTGGTTCAACCTGGACGGAGTCTGAGATTGTCTTGCCTGGCTTCCGGCTTTACTTTC  
 AATGATTACGCCATGCACTGGGTACGCCAGGCGCCTGGAAAGGGTCTGGAGTGGGT  
 TTCCGTGATATCCTGGAATAGTGATAGTATAGGCTATGCCGATAGTGTAAGGAA  
 GGTTTACAATCTCTAGGGATAACGCTAAGAACAGCCTGTACCTTCAAATGCATAGTC  
 TCCGGGCTGAGGACACAGCCTTGTACTATTGTGCTAAGGACAATCATTATGGAAGCG  
 GGTCATATTACTATCAATATGGGATGGATGTGTGGGGTCAGGGAACGACCGTTA  
 CGGTATCCTCAACCACCACCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCCACCATCG  
 CGTCACAGCCTCTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGGCC  
 GTGCATACGAGAGGTTTGGACTTCGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCC  
 GGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGC  
 AGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACT  
 CAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTG  
 AACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG  
 AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA  
 CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAAC  
 CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG  
 TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC  
 AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG  
 CCCCCTCGCTAA).

[00129] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид 2B7-CD8-BBz, содержит последовательность SEQ ID NO:16 (ATGTCCGTACCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAG  
 ATGCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG  
 AGCCGCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACTACTTAGCCTGGTACCA  
 ACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCA  
 CTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCA

TCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACT  
 GGCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAGAGGTGGAGGTGGATCT  
 GGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAG  
 GCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT  
 TTCGAGATTATAACCATGCACTGGGTCCGGCAAGGTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGG  
 GTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGATTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGC  
 CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGT  
 CTGAGAGTTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAGCTCAGTGGGACCTACAG  
 GGACTACTTCTACGGAGTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC  
 AACCACCACCCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCCACCATCGCGTCACAGCC  
 TCTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGGCCGTGCATACGA  
 GAGGTTTGGACTTCGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTG  
 GGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC  
 TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG  
 ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTG  
 AAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTA  
 TAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG  
 GCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG  
 CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGA  
 TGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGT  
 ACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA  
 ).

[00130] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид 9C11-CD8-BBz, содержит последовательность SEQ ID NO:17 (ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAG  
 ATGCGAAATTGTGGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG  
 AGCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTCAGACTACTACCAGTACTTAGCCTGGTACCG  
 ACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCG  
 CTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCA  
 TCAACAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCTGCGTACCAACT  
 GGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAGGTGGAGGTGGATCTGGA  
 GGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACT  
 CGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCA  
 GTGACTCCTACATGACTTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTT  
 TCATTCATTAGTAGTAGTGGAAGTACCATATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGA  
 TTCACCATTTCCAGGGACAACGTCAAGAAGTCATTGTATCTGCAGATGAACAGACTG  
 AGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGAACCAGGAAACTACGT  
 CTATTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAACCAC  
 CACCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCCACCATCGCGTCACAGCCTCTTAG  
 CCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGGCCGTGCATACGAGAGGTT

TGGACTTCGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCC  
 TTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGT  
 ATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGC  
 TGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTT  
 CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACG  
 AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG  
 GACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT  
 ACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAA  
 AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG  
 CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA).

[00131] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность с оптимизированным кодоном, кодирующую шарнирную область CD8 $\alpha$ . Примеры последовательностей нуклеиновых кислот шарнирной области CD8 $\alpha$  с оптимизированными кодонами включают, без ограничения, SEQ ID NO: 18 (ACCACCACCCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCCACCATCGCGTCA  
 CAGCCTCTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGGCCGTGCA  
 TACGAGAGGTTTGGACTTCGCCTGCGAT). В некоторых вариантах осуществления, шарнирная область CD8 $\alpha$  кодируется следующей последовательностью SEQ ID NO:19 (ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTTCGAGCC  
 CCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGA  
 GGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT).

[00132] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий домен 3B9 и содержит следующую последовательность, кодирующую шарнирный домен CD8 $\alpha$  SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий домен 2B7 и содержит следующую последовательность, кодирующую шарнирный домен CD8 $\alpha$  SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий домен 9C11 и содержит следующую последовательность, кодирующую шарнирный домен CD8 $\alpha$  SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует связывающий домен 3H7 и содержит следующую последовательность, кодирующую шарнирный домен CD8 $\alpha$  SEQ ID NO: 19.

[00133] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует

SEQ	ID	NO:	35
(MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWV RQAPGKGLEWVSAIIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKRAGDNWNWFDPPWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGDIQMTQSPSSVSASLGDRV TITCRASQGISSWLAWYQRKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADFTLTISLQP EDFATYYCQQAQKSVPTFGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE			

DGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR  
DPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT  
KDTYDALHMQALPPR), полипептид CAR к BCMA, содержащий следующие домены в  
следующем порядке: связывающий домен 16716P, шарнирный и трансмембранный домен  
CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[00134] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота  
кодирует SEQ ID NO: 36

(MSVPTQVLGLLLLWLTDARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYISWIR  
QAPGKGLEWVSYISSSGSSIKYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
REGGNYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGDIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT  
CRASQGINNWLWVYQQKPGKAPKLLIYAATSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQANSFPPTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH  
TRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG  
CSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK  
DTYDALHMQALPPR), полипептид CAR к BCMA, содержащий следующие домены в  
следующем порядке: связывающий домен 16747P, шарнирный и трансмембранный домен  
CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

[00135] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота  
кодирует SEQ ID NO:37

(MSVPTQVLGLLLLWLTDARCQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINYYYWNWIR  
QPPGKGLEWIGYISYSGNTNYNPSLKSRTISVATSRNQFSLTLSSVTAADTAVYYCARF  
AEYCGGNICYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGGEIVLTQSPGTLSPGE  
RATFSCRASQSVGSSFLAWYQQKPGQAPRRLMYGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS  
RLEPEDFAVYYCQCGGSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  
AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ  
TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD  
KRRGRDPPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ  
GLSTATKDTYDALHMQALPPR), полипептид CAR к BCMA, содержащий следующие  
домены в следующем порядке: связывающий домен 21587N, шарнирный и  
трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB и сигнальный домен  
CD3 $\zeta$ .

[00136] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота  
кодирует SEQ ID NO:38

(MSVPTQVLGLLLLWLTDARCQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYISWIR  
QAPGKGLEWVSYISSSGSSIKYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
REGGNYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGDIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT  
CRASQGINNWLWVYQQKPGKAPKLLIYAATSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQANSFPPTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH  
TRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG



CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK  
DTYDALHMQUALPPRAKRSRSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLH  
AARNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD  
ASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHVHIVQMFINTS\*),

полипептид CAR к BCMA, содержащий следующие домены в следующем порядке: связывающий домен 16747P, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB, сигнальный домен CD3 $\zeta$ , фурин+P2A домен расщепления, сигнал секреции и домен sIL15.

[00137] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид CAR 16716P к BCMA, содержит последовательность SEQ ID NO:39

(ATGAGCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCAAG  
GTGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCCC  
TGAGGCTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCTCCTACGTGATGTCCTGGG  
TGCGCCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGTCTGCCATCATCGGCTCTGGC  
GGCAGCACATACTATGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAA  
CTCTAAGAATACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAGGACACCGCCG  
TGTAATAATTGCGCCAAGAGAGCCGGCGACAACCTGGAATTGGTTTGATCCATGGGGC  
CAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGAGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGAA  
GCGGCGGAGGAGGCGACATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCTGTGAGCGCCTCC  
CTGGGCGATAGGGTGACCATCACATGTCGCGCCTCTCAGGGCATCAGCTCCTGGCTG  
GCATGGTACCAGAGGAAGCCAGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATGCAGCATC  
TAGCCTGCAGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTTCTCTGGAAGCGGATCCGGAGCAGACTT  
TACCCTGACAATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTCCGCCACCTACTATTGTCAGCA  
GGCCAAGTCCGTGCCATTCACCTTTGGCCCCGGCACAAAGGTGGATATCAAGACCA  
CCACCCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCACCATCGCGTCACAGCCTCTTA  
GCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGGCGTGCATACGAGAGGT  
TTGGACTTCGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTC  
CTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG  
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGG  
CTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGT  
TCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC  
GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG  
GGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTG  
TACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAA  
AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG  
CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA).

[00138] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид CAR 16747P к BCMA, содержит последовательность SEQ ID

NO:40

(ATGAGCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCAAG  
 GTGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGAGGAAGC  
 CTGAGGCTGTCCTGCGCCGCTCTGGCTTACCTTTAGCGACTACTATATCTCCTGGA  
 TCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGTCCTACATCAGCTCCTCTGGC  
 AGCTCCATCAAGTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAAC  
 GCCAAGAATTCTCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCGT  
 GTACTATTGCGCCAGAGAGGGCGGCAATTATGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCA  
 CCACAGTGACCGTGTCTAGCGGCGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGCGG  
 AGGAGGCGACATCCAGATGACACAGAGCCCATCCAGCGTGAGCGCCAGCGTGGGGCG  
 ATAGGGTGACCATCACATGTCGCGCCTCCCAGGGCATCAACAATTGGCTGGTGTGGT  
 ACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTATGCAGCCACCTCCCTG  
 CAGTCTGGAGTGCCTAGCCGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGAACCGACTTTACCCTG  
 ACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATTTTGCCACATACTATTGTCAGCAGGCCAAC  
 TCCTTCCCCCTACCTTTGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAGACCACCACCCCT  
 GCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCCACCATCGCGTCACAGCCTCTTAGCCTGCGA  
 CCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGTGGGGCGGTGCATACGAGAGGTTTGGACTT  
 CGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCT  
 GTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATT  
 CAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT  
 GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAG  
 GAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA  
 ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCT  
 GAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG  
 AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGA  
 GCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA  
 AGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA).

[00139] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид CAR 21587N к ВСМА, содержит последовательность SEQ ID NO:41

(ATGAGCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCAAG  
 GTGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCATCCGAGACCC  
 TGTCTCTGACCTGCACAGTGAGCGGCGGCTCCATCAATTACTATTACTGGAAGTGG  
 TCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCAGCTATTCCGGC  
 AACACCAATTACAACCCTTCTCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTGGCCACATC  
 CCGCAATCAGTTCAGCCTGACACTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGT  
 ATTAAGTGCAGAGGTTTGCAGAGTACTGCGGAGGCAACATCTGTTACTATGGCA  
 TGGACGTGTGGGGCCAGGGCACACAGTGACCGTGTCTAGCGGCGGCGGGCTCT  
 GGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAGATCGTGCTGACCCAGTCCCAGGCA  
 CACTGTCTCTGAGCCCTGGAGAGAGGGCCACATTCTTGTGCGCGCCTCCAGTCTG

TGGGCTCCTCTTTTCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCCACGGAGA  
 CTGATGTATGGAGCATCCAATAGGGCAACCGGAATCCCAGACAGATTCAGCGGCTC  
 CGGCTCTGGCACAGACTTCACCCTGACAATCAGCAGACTGGAGCCAGAGGACTTCG  
 CCGTGTACTATTGCCAGCAGTGTGGAGGATCCCCATGGACCTTTGGCCAGGGAACA  
 AAGGTGGAGATCAAGACCACCACCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCAC  
 CATCGCGTCACAGCCTCTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGG  
 GGGCCGTGCATACGAGAGGTTTGGACTTCGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCT  
 TGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACG  
 GGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAA  
 CTA CTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGA  
 TGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGG  
 CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT  
 TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAA  
 GAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT  
 ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCT  
 TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG  
 CCCTGCCCCCTCGCTAA).

[00140] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота,  
 кодирующая полипептид CAR 16747P+sIL15 к BCMA, содержит последовательность SEQ  
 ID NO:42

(ATGAGCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCAAG  
 GTGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGAGGAAGC  
 CTGAGGCTGTCCTGCGCCGCTCTGGCTTCACCTTTAGCGACTACTATATCTCCTGGA  
 TCAGGCAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGTCCTACATCAGCTCCTCTGGC  
 AGCTCCATCAAGTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAAC  
 GCCAAGAATTCTCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACAGCCGT  
 GTA CTATTGCGCCAGAGAGGGCGGCAATTATGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCA  
 CCACAGTGACCGTGTCTAGCGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGCGG  
 AGGAGGCGACATCCAGATGACACAGAGCCCATCCAGCGTGAGCGCCAGCGTGGGGCG  
 ATAGGGTGACCATCACATGTCGCGCCTCCCAGGGCATCAACAATTGGCTGGTGTGGT  
 ACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTATGCAGCCACCTCCCTG  
 CAGTCTGGAGTGCCTAGCCGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGAACCGACTTTACCCTG  
 ACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATTTTGCCACATACTATTGTCAGCAGGCCAAC  
 TCCTTCCCCCTACCTTTGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAGACCACCACCCT  
 GCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCCAACATCGCGTCACAGCCTCTTAGCCTGCGA  
 CCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGTGGGGCGGTGCATACGAGAGGTTTGGACTT  
 CGCCTGCGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCT  
 GTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATT  
 CAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT  
 GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAG

GAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA  
 ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT  
 GAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG  
 AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGA  
 GCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA  
 AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCCGCGCGAAGCGA  
 TCAGGCAGCGGGGCGACAAATTTACGCCTTCTGAAACAAGCAGGCGACGTGGAAGA  
 AAACCCCGGTCCAATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCT  
 GCTCCACGCCGCCAGGCCGAAGTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTG  
 AAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTT  
 ACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTT  
 CACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAG  
 CAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGT  
 GAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTC  
 CAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA).

[00141] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует SEQ ID NO: 46 (MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEIVMTQSPATLSVSPGERTTLSCRASQSVSSNLAWYLQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPITFG QGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMH WVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDNSYGKFYYGLDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPKQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPRSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALL LHAARPNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLEELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS\*), полипептид CAR к CD20, содержащий следующие домены в следующем порядке: связывающий домен 3H7, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB, сигнальный домен CD3 $\zeta$ , домен расщепления P2A (GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP, SEQ ID NO: 47), сигнал секреции и домен sIL15.

[00142] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует SEQ ID NO:48(MSVPTQVLGLLLLWLTDARCEIVMTQSPATLSVSPGERTTLSCRASQSVSSNLAWYLQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDNSYGKFYYGLDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM

RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
 DVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHD  
 GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMRISKPHLRSISI  
 QCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY  
 TESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE  
 CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS\*), полипептид CAR к CD20, содержащий  
 следующие домены в следующем порядке: связывающий домен 3H7, шарнирный и  
 трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB, сигнальный домен  
 CD3 $\zeta$ , домен расщепления P2A SEQ ID NO: 47, сигнал секреции SEQ ID NO: 49  
 (MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAG IHVFILGCFSAGLPKTEA) и домен sIL15.

[00143] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота,  
 кодирующая полипептид CAR+sIL15 к CD20, содержит последовательность SEQ ID  
 NO:50

(ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAG  
 ATGCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA  
 GAACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACC  
 TTCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA  
 CTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTCACCA  
 TCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACT  
 GGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGAGATTAAGGTGGAGGTGGATCT  
 GGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAG  
 GCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT  
 TTTATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGG  
 GTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGC  
 CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGT  
 CTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGGAAA  
 GTTCTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAC  
 CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCC  
 TGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGG  
 GGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGG  
 GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAATC  
 CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGA  
 TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGA  
 AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT  
 AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG  
 CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC  
 CTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT  
 GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA  
 CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGTA  
 GCGGGGCTACGAACTTCTCCCTTCTTAAACAAGCGGGAGACGTGGAAGAAAATCCC

GGACCTATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCAC  
 GCCGCCAGGCCGAACCTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCT  
 TATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAGT  
 TGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAG  
 TCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAA  
 CAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAAC  
 TGGAGGAAAAAATATTAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGT  
 TCATCAACACTTCTTGA).

[00144] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид CAR+sIL15 к CD20, содержит последовательность SEQ ID NO:51

(ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAG  
 ATGCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA  
 GAACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACC  
 TTCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA  
 CTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTACCA  
 TCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACT  
 GGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGAGATTAAGGTGGAGGTGGATCT  
 GGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAG  
 GCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT  
 TTTATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGG  
 GTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGC  
 CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGT  
 CTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGGAAA  
 GTTCTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAC  
 CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCC  
 TGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGG  
 GGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGG  
 GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTC  
 CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGA  
 TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGA  
 AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT  
 AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG  
 CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC  
 CTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT  
 GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA  
 CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGTA  
 GCGGGGCTACGAACTTCTCCCTTCTTAAACAAGCGGGAGACGTGGAAGAAAATCCC  
 GGACCTATGAGAATTTGAAACCACATTTGAGAAGTATTTCCATCCAGTGCTACTTG  
 TGTTTACTTCTAAACAGTCATTTTCTAACTGAAGCTGGCATTTCATGTCTTCATTTGG

GCTGTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAAAACAGAAGCCAACCTGGGTGAATGTAATAAGT  
 GATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATAT  
 ACGGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTG  
 GAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAA  
 AATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCT  
 GGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAATTTTTGCAGAG  
 TTTTGTACATATTGTCCAAATGTTCATCAACACTTCTTGA).

[00145] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота кодирует

SEQ	ID	NO:	57
-----	----	-----	----

(MSVPTQVLGLLLLWLTARCEIVMTQSPATLSVSPGERTTLSCRASQSVSSNLAWYLQ  
 KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFILTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPITFG  
 QGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMH  
 WVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL  
 YYCAKDNSYGKFFYYGLDVWGQGTTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  
 AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ  
 TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
 KRRGRDPENGGKPKQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR\*), полипептид CAR к CD20, содержащий следующие

домены в следующем порядке: связывающий домен 3H7, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий эндодомен 4-1BB, и сигнальный домен CD3 $\zeta$ ; и через внутренний участок посадки рибосомы (например, кодируемый SEQ ID NO: 56) 3' области кодируемой SEQ ID NO: 57, выделенная нуклеиновая кислота дополнительно кодирует

SEQ	ID	NO:	58
-----	----	-----	----

(MALPVTALLLPLALLHAARPNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHP  
 SCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEK  
 NIKEFLQSFVHIVQMFINTS\*), сигнал секреции SEQ ID NO: 33 и домен sIL15.

[00146] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид CAR+sIL15 к CD20, содержит последовательность SEQ ID NO:59

(ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAG  
 ATGCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA  
 GAACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACC  
 TTCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA  
 CTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTCACCA  
 TCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACT  
 GGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGAGATTAAGGTGGAGGTGGATCT  
 GGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAG  
 GCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT  
 TTTATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGG  
 GTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGC

CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGCTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGT  
CTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGGAAA  
GTTCTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAC  
CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCC  
TGTCCCTGCGCCCAGAGGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGG  
GGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGG  
GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTC  
CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGA  
TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGA  
AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT  
AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG  
CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGC  
CTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT  
GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA  
CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAGA  
GTAAGGCGGCGCTACGTAATTCGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTG  
GCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCA  
TATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGA  
GCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTGCG  
TGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACC  
CTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCC  
ACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTT  
GGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTG  
AAGGATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCAC  
ATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGG  
GGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATATTAATTAAGCCACCGCCATGGCCT  
TACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGA  
ACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGC  
ATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACAG  
CAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAA  
GTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTA  
ATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAAA  
TATTAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCT  
TGA).

[00147] В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота представляет собой линейную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота представляет собой кольцевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота представляет собой вектор, такой как плазмидный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор, вирусный вектор, ретровирусный вектор или



лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота или, *например*, ее непрерывная часть, содержащая трансмембранный домен связывающего домена и один или более сигнальных и/или костимулирующих эндодоменов, интегрирована в геном клетки-хозяина, такой как  $\gamma\delta$  Т-клетка-хозяин. В примерном варианте осуществления, выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ретровирусный вектор.

#### **$\gamma\delta$ Т-клетки:**

[00148] Аспекты настоящего изобретения включают  $\gamma\delta$  Т-клетки, которые функционально экспрессируют выделенную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, и тем самым экспрессируют CAR на поверхности  $\gamma\delta$  Т-клетки.

[00149] Аспекты настоящего изобретения могут дополнительно или альтернативно включать  $\gamma\delta$  Т-клетки, обладающие цитотоксической активностью *in vitro* или *in vivo* против гематологической опухолевой клетки демонстрирующей экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА). В некоторых случаях цитотоксическая активность является врожденной активностью. В некоторых случаях цитотоксичность по меньшей мере частично, в значительной степени (> около 25%) или полностью, обусловлена присутствием конструкции CAR, имеющей связывающий домен, который специфически связывается с ТАА, экспрессируемым на поверхности гематологической опухолевой клетки. В некоторых случаях  $\gamma\delta$  Т-клетки имеют активность относительно уничтожения гематологических опухолевых клеток выше, чем таковая для врожденного уровня *in vitro* и/или *in vivo* активности по уничтожению гематологических опухолевых клеток для контрольной  $\gamma\delta$  Т-клетки. В некоторых случаях контрольная  $\gamma\delta$  Т-клетка не содержит конструкции CAR. В некоторых случаях контрольная  $\gamma\delta$  Т-клетка содержит конструкцию CAR, лишенную описанного в настоящем документе связывающего домена, описанной в настоящем документе шарнирной области, описанного в настоящем документе трансмембранного домена, описанного в настоящем документе сигнального домена и/или описанного в настоящем документе костимулирующего домена.

[00150] В некоторых случаях цитотоксичность по меньшей мере частично, в значительной степени (> около 25%) или полностью, обусловлена присутствием конструкции CAR, имеющей связывающий домен, который специфически связывается с CD20 или эпитопом в пределах CD20. В некоторых случаях  $\gamma\delta$  Т-клетки функционально экспрессируют CD20-специфический CAR, кодируемый выделенной нуклеиновой кислотой, описанной в настоящем документе.

[00151] В некоторых вариантах осуществления,  $\gamma\delta$  Т-клетки, описанные в настоящем документе, могут проявлять ограниченную HLA (*например*, ограниченную HLA класса I) цитотоксичность. В других вариантах осуществления, большая часть (> 50%), практически вся (> 90%) или вся цитотоксическая активность не ограничивается HLA (*например*, ограниченной HLA класса I). Ограниченная HLA цитотоксическая активность может быть оценена путем сравнения цитотоксичности *in vitro* в линии

опухолевых клеток HLA (*например*, HLA класса I) (null) с цитотоксичностью *in vitro* в линии опухолевых клеток HLA+ (*например*, HLA класса I<sup>+</sup>). В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая активность, ограниченная HLA, по меньшей мере частично, в значительной степени (> 25%) или полностью обеспечивается использованием домена связывания, подобного T-клеточному рецептору. Домены связывания, подобные T-клеточному рецептору представляют собой связывающие домены, которые специфически распознают антиген, когда он представлен на поверхности клетки в комплексе с молекулой МНС. Домены связывания, подобные T-клеточному рецептору, дополнительно описаны, *например*, в WO 2016/199141.

[00152]  $\gamma\delta$  T-клетки, описанные в настоящем документе, могут проявлять сильную и/или стойкую активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток. В некоторых случаях активность по уничтожению гематологических опухолевых клеток может сохраняться в течение по меньшей мере от около 6 дней до 120 дней или по меньшей мере от около 6 дней до 180 дней с момента первого контакта с гематологической опухолевой клеткой. В некоторых случаях активность по уничтожению гематологических опухолевых клеток  $\gamma\delta$  T-клеткой, описанной в настоящем документе, или ее потомством может сохраняться в течение, по меньшей мере, от около 6 дней до 120 дней, или, по меньшей мере, от около 6 дней до 180 дней, с момента первого контакта с гематологической опухолевой клетки, или от введения  $\gamma\delta$  T-клетки, описанной в настоящем документе. Эта стойкая активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток может проявляться *in vitro*, *in vivo*, или и в *in vitro* и в *in vivo*.

[00153] Аспекты настоящего изобретения могут дополнительно или альтернативно включать  $\gamma\delta$  T-клетки, которые пролиферируют в ответ на контакт с клетками, которые демонстрируют экспрессию или сверхэкспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА). Клетки, которые демонстрируют экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА), могут быть нормальными гематологическими клетками, такими как нормальные В-клетки. Клетки, которые демонстрируют экспрессию или сверхэкспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА), могут быть гематологическими опухолевыми клетками. В некоторых случаях пролиферация является врожденной активностью. В некоторых случаях пролиферация по меньшей мере частично, в значительной степени (> около 20% или > около 25%) или полностью, обусловлена присутствием конструкции CAR, имеющей связывающий домен, который специфически связывается с экспрессируемым на поверхности гематологической клетки или гематологической опухолевой клетки ТАА. В некоторых случаях  $\gamma\delta$  T-клетки демонстрируют более высокий уровень пролиферации *in vitro* и/или *in vivo* по сравнению с контрольными  $\gamma\delta$  T-клетками. В некоторых случаях контрольная  $\gamma\delta$  T-клетка не содержит конструкцию CAR. В некоторых случаях контрольная  $\gamma\delta$  T-клетка содержит конструкцию CAR, лишенную описанного в настоящем документе связывающего домена,

описанной в настоящем документе шарнирной области, описанного в настоящем документе трансмембранного домена, описанного в настоящем документе сигнального домена и/или описанного в настоящем документе костимулирующего домена.

[00154] В некоторых случаях пролиферация, по меньшей мере, частично, в значительной степени ( $>$  около 20% или  $>$  около 25%) или полностью, обусловлена присутствием конструкции CAR, имеющей связывающий домен, который специфически связывается с CD20 или эпитопом в пределах CD20. В некоторых случаях  $\gamma\delta$  Т-клетки, демонстрирующие пролиферацию в ответ на приведение в контакт с гематологической клеткой или гематологической опухолевой клеткой, которая демонстрирует экспрессию CD20 на клеточной поверхности, функционально экспрессируют специфичный для CD20 CAR, кодируемый выделенной нуклеиновой кислотой, описанной в настоящем документе.

[00155] Описанные в настоящем документе  $\gamma\delta$  Т-клетки могут проявлять устойчивую и/или стойкую пролиферацию в организме-хозяине, который включает гематологическую клетку или гематологическую опухолевую клетку, которая демонстрирует экспрессию или сверхэкспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА). В некоторых случаях пролиферация может сохраняться в течение по меньшей мере от около 6 дней до 120 дней или по меньшей мере от около 6 дней до 180 дней, с момента первого контакта с гематологической опухолевой клетки или от момента введения  $\gamma\delta$  Т-клетки в организм-хозяин. В некоторых случаях пролиферация описанной в настоящем документе  $\gamma\delta$  Т-клетки или ее потомства в организме-хозяине, который содержит гематологическую клетку или гематологическую опухолевую клетку, которая демонстрирует экспрессию или сверхэкспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА), может сохраняться в течение по меньшей мере от около 6 дней до 120 дней или по меньшей мере от около 6 дней до 180 дней с момента первого приведения в контакт с гематологической клеткой или гематологической опухолевой клеткой или с момента первого введения  $\gamma\delta$  Т-клетки в организм-хозяин. В некоторых случаях пролиферация в организме-хозяине по меньшей мере частично, в значительной степени ( $>$  около 20% или  $>$  около 25%) или полностью, обусловлена присутствием конструкции CAR, имеющей связывающий домен, который специфически связывается с CD20 или эпитопом в пределах CD20. В некоторых случаях  $\gamma\delta$  Т-клетки, демонстрирующие пролиферацию в организме-хозяине, включают гематологическую клетку или гематологическую опухолевую клетку, которая демонстрирует экспрессию CD20 на клеточной поверхности, функционально экспрессируют специфичный для CD20 CAR, кодируемый выделенной нуклеиновой кислотой, описанной в настоящем документе.

[00156] В некоторых вариантах осуществления,  $\gamma\delta$  Т-клетки, описанные в настоящем документе, экспрессируют или постоянно экспрессируют провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа или интерферон гамма, после контакта с гематологической клеткой или гематологической опухолевой клеткой. В некоторых вариантах осуществления,  $\gamma\delta$  Т-клетки, описанные в настоящем документе, или

их потомство, экспрессируют или постоянно экспрессируют провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа или интерферон гамма, после контакта с гематологической клеткой или гематологической опухолевой клеткой, например, в организме-хозяине, содержащем гематологическую клетку или гематологическую опухолевую клетку.

[00157] В некоторых вариантах осуществления,  $\gamma\delta$  Т-клетка или фармацевтическая композиция, содержащая  $\gamma\delta$  Т-клетку, по существу не проявляет или не проявляет реакции «трансплантат против хозяина» при введении в аллогенный организм-хозяин. В некоторых вариантах осуществления,  $\gamma\delta$  Т-клетка или фармацевтическая композиция, содержащая  $\gamma\delta$  Т-клетку, демонстрирует клинически приемлемый уровень реакции «трансплантат против хозяина» при введении в аллогенный организм-хозяин. В некоторых вариантах осуществления, клинически приемлемый уровень представляет собой уровень реакции «трансплантат против хозяина», которая не требует прекращения лечения  $\gamma\delta$  Т-клетками для достижения терапевтически эффективного лечения. В некоторых вариантах осуществления, клинически приемлемый уровень реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) представляет собой острый ответ, который менее серьезен, чем степень С согласно применимой шкале оценок IBMTR. Тяжесть острой реакции «трансплантата против хозяина» определяется путем оценки степени поражения кожи, печени и желудочно-кишечного тракта. Стадии поражения отдельных органов объединяются для получения общей оценки, имеющей прогностическое значение. РТПХ I (А) степени характеризуется как легкое заболевание, РТПХ II (В) степени - как умеренное, РТПХ III (С) степени - как тяжелое, и РТПХ IV (D) степени - как опасное для жизни. Система оценок IBMTR определяет степень тяжести острой РТПХ следующим образом (Rowlings et al., Br J Haematol 1997; 97:855):

Степень А - Стадия 1 только поражение кожи (макулопапулезная сыпь на <25% тела) без поражения печени или желудочно-кишечного тракта.

Степень В - Стадия 2 поражение кожи; 1-2 Стадии поражения кишечника или печени

Степень С - Стадия 3 поражения любой системы органов (генерализованная эритродермия; билирубин от 6,1 до 15,0 мг/дл; диарея от 1500 до 2000 мл/день)

Степень D - Стадия 4 поражения любой системы органов (генерализованная эритродермия с буллезным образованием; билирубин >15 мг/дл; диарея > 2000 мл/день ИЛИ боль ИЛИ кишечная непроходимость).

См., также, Schoemans et al., Bone Marrow Transplantation volume 53, pages1401-1415 (2018), например, Таблицы 1 и 2, в которых раскрываются критерии оценки и классификации острой РТПХ.

[00158] В некоторых вариантах осуществления,  $\gamma\delta$  Т-клетка или фармацевтическая композиция, содержащая  $\gamma\delta$  Т-клетку, демонстрирует сниженный или существенно сниженный уровень реакции «трансплантат против хозяина» при введении в аллогенный организм-хозяин по сравнению с уровнем реакции «трансплантат против хозяина»,

проявляемым контрольными  $\alpha\beta$  Т-клетками, или наблюдаемым при введении контрольной фармацевтической композиции, содержащей контрольные  $\alpha\beta$  Т-клетки, вводимые в аллогенный организм-хозяин. В некоторых случаях контрольная  $\alpha\beta$  Т-клетка представляет собой аллогенную несконструированную контрольную  $\alpha\beta$  Т-клетку. В некоторых случаях контрольная  $\alpha\beta$  Т-клетка не содержит CAR или не содержит того же CAR, что и соответствующая  $\gamma\delta$  Т-клетка.

[00159] Раскрытые в настоящем документе  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть  $\delta 1$ ,  $\delta 2$ ,  $\delta 3$  или  $\delta 4$   $\gamma\delta$  Т-клетками или их комбинациями. В некоторых случаях  $\gamma\delta$  Т-клетки являются в большинстве ( $> 50\%$ ), в основном всеми ( $> 90\%$ ), практически всеми или полностью  $\delta 2^+$   $\gamma\delta$  Т-клетками. В некоторых случаях  $\gamma\delta$  Т-клетки составляют большинство ( $> 50\%$ ), в основном все ( $> 90\%$ ), практически все или полностью  $\delta 1$   $\gamma\delta$  Т-клетки.

[00160]  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть получены от аллогенного или аутологичного донора.  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть частично или полностью очищены или не очищены и размножены *ex vivo*. Способы и композиции для размножения *ex vivo* включают, без ограничения, те, которые описаны в WO 2017/197347. Размножение может быть выполнено до или после, или до и после введения конструкции CAR в  $\gamma\delta$  Т-клетку (клетки).

[00161] Описанные в настоящем документе  $\gamma\delta$  Т-клетки можно хранить, например криоконсервировать, для использования при переносе адоптивных клеток.

#### **Способы ингибирования или уничтожения опухолевых клеток**

[00162] Одна или более несконструированных популяций  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированные популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смеси, обладающие цитотоксической активностью против гематологической опухолевой клетки, могут вводиться субъекту в любом порядке или одновременно. В случае одновременного введения, множественная несконструированная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смеси по настоящему изобретению могут быть предоставлены в единой унифицированной форме, такой как внутривенная инъекция, или в виде нескольких форм, например, в виде нескольких внутривенных инфузий, п/к, инъекций или таблеток. Несконструированная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смеси по настоящему изобретению могут быть упакованы вместе или по отдельности, в единую упаковку или во множество упаковок. Одна или вся несконструированная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смеси по настоящему изобретению могут быть введены в нескольких дозах. В случае неодновременного введения, время между несколькими дозами может варьироваться до недели, месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или около года. В некоторых случаях несконструированная, обогащенная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированная, обогащенная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смеси по настоящему изобретению могут пролиферировать в организме субъекта, *in vivo*, после введения субъекту. Одна или более несконструированных популяций  $\gamma\delta$  Т-клеток, одна или более сконструированных популяций  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или

их смеси могут быть заморожены, чтобы обеспечить клетки для нескольких обработок одним и тем же клеточным препаратом. Одна или более несконструированных популяций  $\gamma\delta$  Т-клеток, одна или более сконструированных популяций  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смесей по настоящему описанию и фармацевтические композиции, содержащие их, могут быть упакованы в виде набора. Набор может включать инструкции (например, напечатанные инструкции) по использованию несконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смесей, и композиции, содержащей их.

[00163] В некоторых случаях способ лечения гематологического онкологического заболевания включает введение субъекту терапевтически эффективного количества несконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смесей, причем введение лечит гематологическое онкологическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество несконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смесей вводят в течение по меньшей мере около 10 секунд, 30 секунд, 1 минуты, 10 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев или 1 года. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество несконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смесей вводится в течение по меньшей мере одной недели. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество несконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированной популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смесей вводится в течение по меньшей мере двух недель.

[00164] Несконструированная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток, сконструированная популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или их смеси, описанные в настоящем документе, могут вводиться до, во время или после возникновения заболевания или состояния, а также во время введения фармацевтической композиции, содержащей популяцию  $\gamma\delta$  Т-клеток, может варьироваться. Например, популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток может использоваться в качестве профилактического средства и может вводиться непрерывно субъектам со склонностью к состояниям или заболеваниям, чтобы снизить вероятность возникновения заболевания или состояния. Первоначальное введение может осуществляться любым практическим путем, например, любым путем, описанным в настоящем документе, с использованием любого описанного в настоящем документе состава. В некоторых примерах введение популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток по настоящему изобретению представляет собой внутривенное введение. Одна или более доз популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток могут быть введены, как только это практически осуществимо после начала гематологического онкологического заболевания, и в течение периода времени, необходимого для лечения иммунного заболевания, такого как, например, от около 24 часов до около 48 часов от около 48 часов до около 1 недели, от около 1 недели до около 2 недель, от около 2 недель до около 1 месяца, от около 1

месяца до около 3 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, одну или более доз популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток можно вводить через годы после начала онкологического заболевания и до или после других видов лечения.

[00165] В некоторых вариантах осуществления, популяцию  $\gamma\delta$  Т-клеток вводят одновременно или последовательно одним или более способами для повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь. Используемый в настоящем документе термин «один или более способов для повышения общего уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь» относится к способу или комбинации способов, которые изменяют физиологическое состояние субъекта, так что у субъекта повышается по меньшей мере один уровень цитокина, содержащего общую гамма-цепь. В некоторых вариантах осуществления, способ повышает уровень одного или более цитокинов, содержащих общую гамма-цепь, выбранных из группы, состоящей из IL-2, IL-7 и IL-15, предпочтительно, способ повышает уровень IL-15 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, способ включает лимфодеплецию. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение одного или более цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, субъекту. В некоторых случаях вводят IL-2, IL-7 и/или IL-15, предпочтительно IL-15. В некоторых вариантах осуществления, способ включает секрецию цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, из введенной, например,  $\gamma\delta$  Т-клетки. В некоторых случаях секретируется IL-2, IL-7 и/или IL-15, предпочтительно IL-15.

[00166] В некоторых вариантах осуществления, применение одного или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, включают лимфодеплецию перед введением  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок). В некоторых вариантах осуществления, применение одного или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, включает введение одновременно с введением,  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) или последовательного количества цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, эффективного для увеличения пролиферации, цитотоксической активности, стойкости или их комбинация введенных  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок), предпочтительно, при этом способ включает введение IL-2 или одного или более его миметиков, более предпочтительно при этом способ включает введение IL-15 или одного или более его миметиков. Количество введенного цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, может быть количеством, эффективным для увеличения пролиферации, цитотоксической активности, устойчивости или их комбинации введенных  $\gamma\delta$  Т-клеток до и/или после введения  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок). Типичные количества IL-15 включают, без ограничения, от 0,01 до 10 мкг/кг/дозу каждые 24 часа для IL-15. Типичные количества IL-2 включают, без ограничения, от около  $3 \times 10^6$  до около  $22 \times 10^6$  единиц каждые 8-48 часов. Например, схема введения IL2 при ПКР составляет 600000 международных единиц/кг (0,037 мг/кг) в/в каждые 8 часов, вводимых в течение 15 минут, максимум 14 доз.

[00167] В некоторых вариантах осуществления, применение одного или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, включает

лимфодеплецию перед введением  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) и введение одновременно с введением  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) или последовательно некоторого количества цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, эффективного(ых) для увеличения пролиферации, цитотоксической активности, устойчивости или их комбинации введенных  $\gamma\delta$  Т-клеток.

#### ПРИМЕРЫ

##### [00168] Пример 1

[00169] МКПК человека в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл были активированы в модифицированной среде для культивирования клеток на предварительно покрытых D1-08 или D1-35 антителами к V $\delta$ 1 (см. WO 2017/197347) 24-луночных планшетах (Costar) в течение 5 дней в присутствии IL-2 (100 Ед/мл). На 5 день культуры клеток трансдуцировали  $\gamma$ -ретровирусными конструкциями, кодирующими химерные антигенные рецепторы (2B7-5.1, SEQ ID NO:11; 3B9-5.1, SEQ ID NO:9; 3H7-5.1, SEQ ID NO:10; 9C11-5.1, SEQ ID NO:12) в присутствии ретронектина. На 6 день клетки возвращали в модифицированную среду для культивирования клеток и дополнительно размножали с подпиткой и заменой IL-2 по мере необходимости. На 17, 18 или 19 дни клетки собирали, а оставшиеся  $\alpha\beta$  Т-клетки истощали с использованием набора AutoMACS® (Miltenyi Biotec). Чистоту популяции  $\gamma\delta$  клеток и эффективность трансдукции оценивали с помощью FACS. Параллельно с этим, таким же образом размножали нетрансдуцированные культуры клеток без добавления ретровирусного супернатанта. Как показано на Фиг. 3, нетрансдуцированные размноженные клетки V $\delta$ 1 от нескольких доноров не являются цитотоксичными по отношению к нормальным В-клеткам от аллогенного донора. Введение CAR CD20 в клетки V $\delta$ 1 придавало этим клеткам сильную цитотоксичность по отношению к нормальным В-клеткам. Цитотоксичность измеряли как % аннексина V<sup>+</sup> клеток с помощью проточной цитометрии в 4 часовом анализе.

##### [00170] Пример 2

[00171] Клетки V $\delta$ 1 были активированы, трансдуцированы и размножены таким же образом, как описано выше. Конструкцию 3H7 CAR SEQ ID NO: 10 использовали для демонстрации цитотоксичности по отношению к двум линиям клеток CD20<sup>+</sup> - Daudi и Raji. Как показано на Фиг. 4, введение CAR усиливало врожденную цитотоксичность несконструированных клеток V $\delta$ 1.

##### [00172] Пример 3

[00173] Клетки V $\delta$ 1 были активированы, трансдуцированы и размножены таким же образом, как описано выше. Четыре различных конструкции (SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12) вводили в клетки V $\delta$ 1 во время размножения и тестировали против клеток Raji-Luc. Цитотоксичность определяли измерением общего уровня люминесценции после добавления люминесцентного субстрата D-люциферина (Perkin Elmer) после 18 часов совместной инкубации при различных соотношениях Е/Т. Как показано на Фиг. 5, CAR клетки к CD20, содержащие костимулирующий эндодомен 4-1BB, описанный в настоящем документе, проявляют сильную активность в отношении уничтожения клеток Raji.



[00174] **Пример 4**

[00175] Созданы конструкции CAR с несколькими различными доменами и связывающими CD20 доменами (3H7-CD3z, SEQ ID NO:20; 3H7-5.1, SEQ ID NO:10; и 3H7-CD27z, SEQ ID NO:8). CAR конструкции вводили, как описано выше, и цитотоксичность тестировали в клетках Raji-Luc, как описано в предыдущем примере (18 часовая цитотоксичность при различных соотношениях E/T). Фиг. 6 иллюстрирует устойчивую активность по уничтожению клеток Raji с различными сигнальными и/или костимулирующими доменами.

[00176] **Пример 5**

[00177] Различные конструкции CAR вводили в размноженные клетки V $\delta$ 1 и тестировали в анализе на долговременную цитотоксичность с повторным заражением клеток-мишеней (серийное уничтожение) с использованием прибора IncuCyte®. Вкратце, клетки Raji метили реагентом NucRed и регистрировали общую флуоресценцию клеток с течением времени. Клетки совместно инкубировали при соотношении E/T, равном 3, в течение 72 часов в среде для культивирования без добавления цитокинов. По истечении 72 часов культуры повторно заражали другой дозой клеток Raji и контролировали их гибель. Эту процедуру повторяли с культурами, в которых клетки Raji исчезали через 144 часа. На Фиг. 7 показана конструкция 3H7-ICOSz, в которой костимулирующий эндодомен 4-1BB заменен эндодоменом ICOS (WLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 354)).

[00178] **Пример 6**

[00179] Клетки Raji подкожно вводили мышам NSG (Jackson Labs). Когда опухоли достигали размера около 100 мм<sup>3</sup>, животным вводили 5×10<sup>6</sup> V $\delta$ 1 CD20 CAR+ клеток для сравнения эффективности различных костимулирующих эндодоменов («костимулирующий» или «костим») *in vivo*. Животным одновременно вводили IL-2 (60000 ед/дозу) 3 раза в неделю на протяжении всего исследования. Как показано на Фиг. 8, испытанные конструкции продемонстрировали высокую эффективность *in vivo* при лечении гематологических опухолей у мышей NSG. Не желая быть связанными теорией, предполагается, что оптимизированные конструкции CAR 3H7-5.1, 3H7-CD3z и 3H7-CD27z демонстрируют превосходный контроль размера опухоли *in vivo*, контроль пролиферации, активации, устойчивости и/или цитотоксичности по сравнению с не оптимизированными конструкциями CAR.

[00180] **Пример 7**

[00181] Клетки Raji подкожно вводили мышам NSG (Jackson Labs). Когда опухоли достигали размера около 100 мм<sup>3</sup>, животным вводили 5×10<sup>6</sup> V $\delta$ 1 CAR к CD20+ клеток, которые были предварительно помечены CellTrace Violet. На 2 и 6 день опухоли и различные другие органы извлекали, лизировали и полученную суспензию клеток анализировали на (A) присутствие  $\gamma\delta$  T-клеток и клеток Raji (Фиг. 9) и (B) пролиферацию  $\gamma\delta$  клеток, о чем свидетельствовало разведение красителя CellTrace Violet (Фиг. 10). Животные получали сопутствующий IL-2 (60000 ед/дозу) 3 раза в неделю до 6 дня. Как

показано на Фиг. 9, количество введенных  $\gamma\delta$  Т-клеток значительно увеличилось во внутриопухолевой среде и это способствовало значительному снижению отношения опухолевых клеток к  $\gamma\delta$  Т-клеткам со 2 по 6 день. Как показано на Фиг. 10,  $\gamma\delta$  Т-клетки стабильно пролиферировали и пролиферация наблюдалась преимущественно во внутриопухолевой среде.

[00182] **Пример 8**

[00183] Мышам NSG вводили клетки Raji-Luc (0,5 млн/животное). На 4 день животным вводили  $8,7 \times 10^6$  клеток V $\delta$ 1 CAR+ (SEQ ID NO: 10) или  $6,8 \times 10^5$   $\alpha\beta$  Т-клеток, трансдуцированных той же конструкцией. За выживаемостью животных наблюдали в течение 140 дней. Все животные получили 3 дозы ИЛ-2 (60000/животное) в 0 день, 1 день и 2 день. Как показано на Фиг. 11, введение  $\gamma\delta$  Т-клеток, описанных в настоящем документе, увеличивало выживаемость субъектов, страдающих гематологическим онкологическим заболеванием.

[00184] **Пример 9**

[00185] Мышам SRG-15 (Herndler-Brandstetter et al., PNAS, 2017), экспрессирующим ИЛ-15 человека, вводили клетки Raji-Luc ( $0,5 \times 10^6$ /животное). На 4 день животным вводили  $20,2 \times 10^6$  V $\delta$ 1 CAR+ клеток (SEQ ID NO: 10) или  $1,9 \times 10^6$   $\alpha\beta$  Т-клеток, трансдуцированных той же конструкцией. За выживаемостью животных наблюдали в течение 70 дней. Фиг. 12. Как показано на Фиг. 12, введенные  $\gamma\delta$  Т-клетки не вызывали РТПХ. Напротив, введенные  $\alpha\beta$  Т-клетки вызвали РТПХ.

[00186] **Пример 10**

[00187] Мышам NSG вводили клетки Raji ( $1 \times 10^6$ /животное) подкожно в правый задний бок. Когда объем опухоли достигал  $\sim 100$  мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали и им вводили  $5 \times 10^6$  V $\delta$ 1 CAR Т-клеток, кодирующих CAR к CD20 или CAR к CD20 и растворимый ИЛ-15. Животным одновременно вводили ИЛ-2 (60000 ед/дозу, Reprotech 3x в неделю) на протяжении всего исследования. Четверем животным из группы CD20+sIL15 CAR Т, у которых не было поддающейся измерению опухоли на 62 день, повторно вводили  $1 \times 10^6$  клеток Raji подкожно в противоположный (левый) бок. Также была включена контрольная группа животных, чтобы продемонстрировать кинетику роста опухоли. Результаты представлены на Фиг. 14. Как показано на Фиг. 14, введение  $\gamma\delta$  CAR-Т-клеток, содержащих конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный растворимый ИЛ-15, вызывало стойкий противоопухолевый эффект, который длился более 60 дней (например, от 60 до 110 дней).

[00188] **Пример 11**

[00189] МКПК человека в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл были активированы в среде для культивирования клеток на предварительно покрытых D1-08 или D1-35 антителами к V $\delta$ 1 24-луночных планшетах (Costar) в течение 5 дней в присутствии ИЛ-2 (100 Ед/мл). На 5 день культуры клеток трансдуцировали  $\gamma$ -ретровирусными конструкциями, кодирующими химерные антигенные рецепторы к ВСМА (SEQ ID NO: 35-38) в присутствии ретронектина. На 6 день клетки возвращали в среду для культивирования клеток и

дополнительно размножали с подпиткой и заменой IL-2 по мере необходимости. На 17, 18 или 19 дни клетки собирали, а оставшиеся  $\alpha\beta$  T-клетки истощали с использованием набора AutoMACS® (Miltenyi Biotec). Чистоту популяции  $\gamma\delta$  клеток и эффективность трансдукции оценивали с помощью FACS (Фиг. 15). Вкратце, CAR-T-клетки окрашивали путем инкубации клеток с 1 мкг/мл растворимого рекомбинантного биотинилированного ВСМА (Acro Biosystems). Обнаружение связывания выполняли с использованием стрептавидина-BV421 в рекомендованном производителем разведении 1:500. Параллельно с этим, таким же образом размножали нетрансдуцированные культуры клеток без добавления ретровирусного супернатанта. Размноженные клетки тестировали в анализе цитотоксичности *in vitro* на ВСМА-положительных клеточных линиях. Как показано на Фиг. 16 и 17, нетрансдуцированные размноженные клетки V $\delta$ 1 проявляли некоторую степень цитотоксичности в отношении клеточных линий множественной миеломы и лимфомы Беркитта, которые, как известно, экспрессируют ВСМА в различной степени. Эта цитотоксичность усиливалась введением конструкций CAR к ВСМА. Цитотоксичность определяли измерением общего уровня люминесценции в 96-луночных планшетах с помощью добавления люминесцентного субстрата D-люциферина (Perkin Elmer) после 18 часов совместной инкубации при указанных соотношениях Е/Т. В качестве контроля использовали ВСМА-отрицательную клеточную линию SCABER.

**[00190] Пример 12**

[00191] Клетки множественной миеломы NCI-H929 ( $1 \times 10^6$  /животное) подкожно имплантировали мышам NSG (Jackson Labs). Когда опухоли достигали размера около 200 мм<sup>3</sup>, животным вводили  $5 \times 10^6$  V $\delta$ 1 CAR к ВСМА+клеток для сравнения эффективности полученных из 16716P и 16747P scFv CAR конструкций *in vivo*. Животным одновременно вводили IL-2 (13000 ед/дозу, Proleukin®) 3 раза в неделю на протяжении всего исследования. Результаты представлены на Фиг. 18. Как показано на Фиг. 19, CAR к ВСМА+клетки демонстрируют надежный контроль опухолевой нагрузки *in vivo*.

[00192] Вышеизложенное просто иллюстрирует принципы настоящего изобретения. Понятно, что специалисты в данной области техники смогут разработать различные устройства, которые, хотя и не описаны и не показаны в данном документе явно, воплощают принципы настоящего изобретения и включены в его сущность и объем. Кроме того, все примеры и условные формулировки, приведенные в настоящем документе, главным образом предназначены для того, чтобы помочь читателю понять принципы настоящего изобретения и концепции, внесенные изобретателями в развитие техники, и должны рассматриваться как не ограничивающиеся такими конкретно перечисленными примерами и условиями. Кроме того, все утверждения, в которых приводятся принципы и аспекты настоящего изобретения, а также его конкретные примеры, предназначены для охвата его структурных и функциональных эквивалентов. Кроме того, предполагается, что такие эквиваленты включают как известные в настоящее время эквиваленты, так и эквиваленты, разработанные в будущем, то есть, любые разработанные элементы, которые выполняют одну и ту же функцию, независимо от

структуры. Следовательно, объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения примерными аспектами, показанными и описанными в настоящем документе. Скорее, объем и сущность настоящего изобретения воплощены в прилагаемой формуле изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит

a. связывающий домен, который специфически связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью (ТАА), экспрессируемым на поверхности гематологической опухолевой клетки;

b. шарнирный домен CD8 $\alpha$ ;

c. трансмембранный домен CD8 $\alpha$ ;

d. костимулирующую сигнальную область, при этом, необязательно, костимулирующая сигнальная область выбрана из костимулирующей сигнальной области 4-1BB (CD137) и костимулирующей сигнальной области CD27; и

e. сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

2. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающаяся тем, что (a)-(e) расположены в порядке от 5' до 3'.

3. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что связывающий домен специфически связывается с CD20.

4. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 3, отличающаяся тем, что

a. связывающий домен избирательно связывается с эпитопом в пределах CD20, связываемым антителом к CD20, или конкурирует за связывание с антителом к CD20, выбранным из группы, состоящей из 3B9, 3H7, 2B7 и 9C11, предпочтительно 3H7; и/или

b. связывающий домен содержит определяющие комплементарность области антитела к CD20, выбранные из группы, состоящей из 3B9, 3H7, 2B7 и 9C11, предпочтительно 3H7.

5. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что связывающий домен кодирует:

a. последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) и последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), при этом последовательности HCVR и LCVR представляют собой SEQ ID NO: 99 и 107, соответственно;

b. последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи, 1, 2 и 3 SEQ ID NO: 101, 103 и 105, соответственно, и последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 1, 2 и 3 SEQ ID NO: 109, 111 и 113, соответственно;

c. определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (HCDR3), и CDR3 легкой цепи (LCDR3), при этом HCDR3 и LCDR3 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 345 и 353; 201 и 209; и 249 и 257;

d. последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) и последовательность вариабельной области легкой цепи (LCVR), при этом последовательности HCVR и LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 339 и

347; 195 и 203; и 243 и 251; и/или

е. домен определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (HCDR3), и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), при этом домен HCDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19, где X1=A, V или T; X2=K; X3=D; X4=P, F или G; X5=S или H; X6=Y; X7=G; X8=S или H; X9=G или F; X10=S или Y; X11=Y, N или S; X12=Y, G или H; X13=G, L или S; X14=Y, M или D; X15=Y, D или V; X16 =G, V или отсутствует; X17=M или отсутствует; X18=D или отсутствует; X19=V или отсутствует (SEQ ID NO: 369); и домен LCDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9, где X1=Q; X2=Q; X3=R или S; X4=N, Y или F; X5=N, D, или Y; X6=W; X7=P; X8=L; X9=T (SEQ ID NO: 370).

6. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что связывающий домен специфически связывается с CD19 или BCMA.

7. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 6, отличающаяся тем, что связывающий домен специфически связывается с BCMA.

8. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 7, отличающаяся тем, что:

а. связывающий домен избирательно связывается с эпитопом в пределах BCMA, связываемым антителом к BCMA, или конкурирует за связывание с областью связывания к BCMA, имеющей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 и 28; SEQ ID NO: 29 и 30; и SEQ ID NO: и 31 и 32; и/или

б. связывающий домен содержит определяющие комплементарность области связывания к BCMA, имеющей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27 и 28; SEQ ID NO: 29 и 30; и SEQ ID NO: и 31, и 32.

9. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что CAR содержит:

а. шарнирный домен CD8 $\alpha$ , содержащий SEQ ID NO:1 (PTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY) или SEQ ID NO:2 (TTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY);

б. трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , содержащий SEQ ID NO:3 (IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC); и/или

с. сигнальный домен CD3 $\zeta$ , содержащий:

(i) SEQ ID NO:4 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR ); или

(ii) SEQ ID NO:5 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR).

10. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 9, отличающаяся тем, что CAR содержит:

a. костимулирующую сигнальную область 4-1BB, содержащую SEQ ID NO:6 (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL); или

b. костимулирующую сигнальную область CD27, содержащую SEQ ID NO: 7 (QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP), или

при этом выделенная нуклеиновая кислота кодирует костимулирующую сигнальную область 4-1BB, содержащую SEQ ID NO: 6, и костимулирующую сигнальную область CD27, содержащую SEQ ID NO: 7.

11. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота дополнительно кодирует:

a. секретируемый цитокин; или

b. секретируемый интерлейкин, содержащий общую гамма-цепь; или

c. секретируемый IL-15, предпочтительно при этом IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 34, более предпочтительно, при этом IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 34, функционально связанную с сигнальной последовательностью секреции SEQ ID NO: 33, или при этом IL-15 содержит последовательность SEQ ID NO: 34, функционально связанную с сигнальной последовательностью секреции SEQ ID NO: 49; или

d. секретируемый интерлейкин, содержащий общую гамма-цепь, предпочтительно IL-15, и аминоконец мультицистронной линкерной области по отношению к интерлейкину или сигналу секреции интерлейкина, при этом мультицистронная линкерная область содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 43-45, 47 или 52-55 или их комбинацию, или кодирует внутренний участок посадки рибосомы, например, SEQ ID NO: 56 или 60.

12. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5, 9-10 или 11, отличающаяся тем, что, связывающий домен специфически связывается с CD20, и нуклеиновая кислота кодирует SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 20, 46, 48 или 57 и 58.

13. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 12, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота содержит последовательность SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 50, 51 или 59.

14. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-2, 6-10 или 11, отличающаяся тем, что, связывающий домен специфически связывается с ВСМА, и нуклеиновая кислота кодирует SEQ ID NO: 35, 36, 37 или 38.

15. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 14, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота содержит последовательность SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42.

16. Полипептид, содержащий химерный антигенный рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую любой из предшествующих выделенных нуклеиновых кислот по пп. 1-15.

17.  $\gamma\delta$  Т-клетка, содержащая полипептид по п. 16 или содержащая нуклеиновую

кислоту, кодирующую конструкцию CAR по любому из пп. 1-15, причем  $\gamma\delta$  T-клетка функционально экспрессирует связывающий домен полипептида или нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, на поверхности  $\gamma\delta$  T-клетки.

18.  $\gamma\delta$  T-клетка по п. 17, отличающаяся тем, что  $\gamma\delta$  T-клетка проявляет активность *in vitro* и/или *in vivo* в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток, которые демонстрируют экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА).

19.  $\gamma\delta$  T-клетка по п. 18, отличающаяся тем, что активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток указанной  $\gamma\delta$  T-клетки выше, чем врожденная активность *in vitro* и/или *in vivo* в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток для контрольной  $\gamma\delta$  T-клетки, которая не содержит конструкцию CAR.

20.  $\gamma\delta$  T-клетка по п. 19, отличающаяся тем, что  $\gamma\delta$  T-клетка проявляет повышенную активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток в отношении гематологических опухолевых клеток HLA класса I+.

21.  $\gamma\delta$  T-клетка по любому из пп. 18-20, отличающаяся тем, что активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток или повышенная активность в отношении уничтожения гематологических опухолевых клеток сохраняется в течение, в течение около, в течение по меньшей мере или в течение по меньшей мере около от 6 дней до 180 дней после первого приведения в контакт с гематологической опухолевой клеткой.

22.  $\gamma\delta$  T-клетка по любому из пп. 18-21, отличающаяся тем, что  $\gamma\delta$  T-клетка пролиферирует в ответ на приведение в контакт с гематологической опухолевой клеткой, которая демонстрирует экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА).

23.  $\gamma\delta$  T-клетка по любому из пп. 18-22, отличающаяся тем, что  $\gamma\delta$  T-клетка демонстрирует повышенную пролиферацию в ответ на приведение в контакт с гематологической опухолевой клеткой, которая демонстрирует экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА), по сравнению с контрольной  $\gamma\delta$  T-клеткой, которая не экспрессирует функционально нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, на поверхности  $\gamma\delta$  T-клетки.

24.  $\gamma\delta$  T-клетка по любому из пп. 18-23, отличающаяся тем, что  $\gamma\delta$  T-клетка пролиферирует в организме-хозяине, который содержит гематологическую опухолевую клетку, которая демонстрирует экспрессию на клеточной поверхности антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА).

25.  $\gamma\delta$  T-клетка по любому из пп. 22-24, отличающаяся тем, что пролиферация  $\gamma\delta$  T-клетки или повышенная пролиферация  $\gamma\delta$  T-клетки сохраняется в течение, в течение около, в течение по меньшей мере или в течение по меньшей мере около от 6 дней до 180 дней после первого приведения в контакт с гематологической опухолевой клеткой.

26.  $\gamma\delta$  T-клетка по любому из пп. 17-25, отличающаяся тем, что  $\gamma\delta$  T-клетка экспрессирует провоспалительные цитокины, включающие фактор некроза опухоли альфа



или интерферон гамма, после приведения в контакт с гематологической опухолевой клеткой.

27.  $\gamma\delta$  Т-клетка по любому из пп. 17-26, отличающаяся тем, что  $\gamma\delta$  Т-клетка демонстрирует сниженную, существенно сниженную, по существу сниженную, фактически отсутствующую или полностью отсутствующую реакцию «трансплантат против хозяина» при введении в организм аллогенного хозяина по сравнению с реакцией «трансплантат против хозяина», наблюдаемой при введении  $\alpha\beta$  Т-клетки в организм аллогенного хозяина.

28.  $\gamma\delta$  Т-клетка по любому из пп. 17-27, отличающаяся тем, что  $\gamma\delta$  Т-клетка представляет собой  $\delta 1$ ,  $\delta 2$ ,  $\delta 3$  или  $\delta 4$   $\gamma\delta$  Т-клетку, предпочтительно  $\delta 2$ -  $\gamma\delta$  Т-клетку, более предпочтительно  $\delta 1$   $\gamma\delta$  Т-клетку.

29. Множество  $\gamma\delta$  Т-клеток по любому из пп. 17-28.

30. Множество  $\gamma\delta$  Т-клеток по п. 29, отличающееся тем, что множество содержит по меньшей мере около 10<sup>8</sup>  $\gamma\delta$  Т-клеток, предпочтительно от около 10<sup>8</sup>  $\gamma\delta$  Т-клеток до около 10<sup>11</sup>  $\gamma\delta$  Т-клеток.

31. Множество  $\gamma\delta$  Т-клеток по п. 29 или 30, отличающееся тем, что множество включает композицию, которая содержит по меньшей мере 60%, 80% или от около 60% или 80% до около 90% или 95%  $\delta 1$ ,  $\delta 2$ ,  $\delta 3$  или  $\delta 4$   $\gamma\delta$  Т-клеток, предпочтительно  $\delta 1$  или  $\delta 2$   $\gamma\delta$  Т-клеток, более предпочтительно  $\delta 2$ -  $\gamma\delta$  Т-клеток, наиболее предпочтительно  $\delta 1$   $\gamma\delta$  Т-клеток.

32. Способ получения  $\gamma\delta$  Т-клетки по любому из пп. 17-28 или множества  $\gamma\delta$  Т-клеток по любому из пп. 29-31, причем способ включает трансфекцию  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) конструкцией, содержащей последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-15.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что способ включает ретровирусную трансдукцию.

34. Способ по п. 32 или 33, отличающийся тем, что способ включает размножение *ex vivo*  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок), причем размножение *ex vivo* проводят перед трансфекцией и/или после трансфекции последовательностью выделенной нуклеиновой кислоты.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и  $\gamma\delta$  Т-клетки по любому из пп. 17-28 или множество  $\gamma\delta$  Т-клеток по любому из пп. 29-31.

36. Способ уничтожения гематологической опухолевой клетки, включающий приведение в контакт гематологической опухолевой клетки с эффективным для уничтожения опухолевых клеток количеством  $\gamma\delta$  Т-клеток по любому из пп. 17-28; множеством  $\gamma\delta$  Т-клеток по любому из пп. 29-31; или фармацевтической композицией по п. 35.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что способ включает введение терапевтически эффективного количества  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) или фармацевтической композиции в организм-хозяин, содержащий гематологическую опухолевую клетку.

38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что способ включает введение в организм-хозяин, содержащий гематологическую опухолевую клетку, терапевтически эффективного количества,  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) или фармацевтической композиции и одновременное или последовательное применение одного или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что применение одного или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, включает введение одновременно с введением  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) или последовательно некоторого количества цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, эффективного для увеличения пролиферации, цитотоксической активности, стойкости или их комбинации введенной(ых)  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок), предпочтительно, причем способ включает введение IL-2, более предпочтительно при этом способ включает введение IL-15.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что один или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащих общую гамма-цепь, включают введение некоторого количества цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, эффективного для увеличения пролиферации, цитотоксической активности, устойчивости или их комбинации введенной(ых)  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок) до и/или после введения  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок).

41. Способ по любому из пп. 38-40, отличающийся тем, что один или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь, включают лимфодеплецию перед введением  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок).

42. Способ по любому из пп. 38-40, отличающийся тем, что один или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь включают секрецию одного или более цитокинов, содержащих общую гамма-цепь, из введенной  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок).

43. Способ по любому из пп. 37-42, отличающийся тем, что способ снижает опухолевую нагрузку *in vivo* в организме-хозяине и/или увеличивает среднее время выживания организма-хозяина по сравнению с контрольным организмом, причем контрольному организму не вводят  $\gamma\delta$  Т-клетку(и) или фармацевтическую композицию.

44. Способ по любому из пп. 36-43, отличающийся тем, что способ представляет собой способ лечения онкологического заболевания у субъекта, нуждающегося в этом.

45. Применение некоторого количества  $\gamma\delta$  Т-клеток эффективного для уничтожения опухолевых клеток по любому из пп. 17-28; множества  $\gamma\delta$  Т-клеток по любому из пп. 29-31; или фармацевтической композиции по п. 35 при производстве лекарственного средства для лечения онкологического заболевания, вызванного гематологическими опухолевыми клетками, у субъекта, нуждающегося в этом.

46. Способ лечения онкологического заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

а. введение терапевтически эффективного количества  $\gamma\delta$  Т-клеток, причем онкологическое заболевание включает гематологические опухолевые клетки, которые демонстрируют экспрессию CD20 на клеточной поверхности; или

в. введение терапевтически эффективного количества  $\gamma\delta$  Т-клеток, причем онкологическое заболевание включает гематологические опухолевые клетки, которые демонстрируют экспрессию ВСМА на клеточной поверхности.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что способ включает одновременное с введением  $\gamma\delta$  Т-клеток или последовательное применение одного или более способов повышения уровня цитокина(ов), содержащего(их) общую гамма-цепь.

48. Способ по п. 46 или 47, отличающийся тем, что способ включает выполнение множества введений  $\gamma\delta$  Т-клеток, причем интервал между множеством введений составляет по меньшей мере около одной недели, предпочтительно, по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 12 недель, и/или не более чем один раз в 6 или 12 месяцев.

49. Фармацевтическая композиция для применения по любому из способов по пп. 46-48.

По доверенности

Фиг. 1



Последовательности доменов VL и VH белков, связывающихся с CD20 полученных из REGN

Фиг. 2

**3B9**

**VH CDS**

GAAGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTACCTTTAATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGC  
CTGGAATGGGTCTCAGTTATTAGTTGGAATAGTGATAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATCCCTGTATCTGCAAATGCACAGTCTGAGAGCTGA  
GGACACGGCCTTGATTACTGTGCAAAAGATAATCACTATGGTTCGGGGAGTTATTACTACTACCAATACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG

**VH PEP**

EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCVASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSVISWNSDSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMHSRAEDTALYYCAKDNHYGSGSYYYQYGMVWVWGQGTITVTVSS

**VK CDS**

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC  
CGACTCCTCATCTATGGTACATCCACCAGGGCCACTGGTATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTCAA  
CAATAATAAAGTGGCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC

**VK PEP**

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLSLQSEDFAVYYCQYNNWPLTFGGGTKEIK

**9C11**

**VH CDS**

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTCGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTCCTACATGACTTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG  
GCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGTAGTAGTGAAGTACCATATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGGGACAACGTCAGAAGTCAATTGTATCTGCAGATGAACAGACTGAGAGCCG  
AGGACACGGCCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGAACCAGGAAACTACGTCTATTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG

**VH PEP**

QVQLVESGGDSVKPGGSLRLSCAASGFTFSDSYMTWIRQAPGKLEWVSVFSSSGSTIYADSVKGRFTISRDNVKKSLYLQMNRLRAEDTAVYYCAREEPGNVYVYGMVWVWGQGTITVTVSS

**VK CDS**

GAAATTGTGGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTCAGACTACTACCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGACGAAACCTGGCCAGGCTCCCA  
GGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCGCTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTCACTCTCACCATCAACAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTCA  
CTGCGTACCAACTGGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAC

**VK PEP**

EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRSTQTTTSYLAWYRQKPGQAPRLLIYDASNRAAGIPARFSGSGSGTDFTLTINSLEPEDFAVYYCQLRTNWIWTFGGGTRLEIK

Последовательности доменов VL и VH белков, связывающихся с CD20 полученных из REGN

## Фиг. 2 продолжение

### 3H7

#### VH CDS

GAAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTTATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAAGCTCCAGGGAAGG  
GCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGA  
GCTGAGGACACGGCCTTGATTACTGTGCAAAAGATAACAGCTATGAAAAGTTCTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAAGGTCACCGTCTCCTCAG

#### VH PEP

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFYDYAMHWVVRQAPGKLEWVSGISWNSGYIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDNSYKGFYVGLDVMWGQTTVTVSS

#### VK CDS

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAACCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCTTCAGAAACCTGGCCAGGCTC  
CCAGGCTCCTCATCTATGGTGATCCACCAAGGGCCACTGGTATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCATTCTACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGAGTTTACT  
GTCAGCAGTATAATAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGGCTGGAGATTAAC

#### VK PEP

EIVMTQSPATLSVSPGERITLSCRASQSVSSNLAHWYLRQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSTEFITLTISSLQSEDFAVYYCQYNNWPITFGQGRLEIK

### 2B7

#### VH CDS

GAAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTCGAGATTATACCATGCACTGGGTCCGGCAAAGTCCAGGGAAG  
GGCCTGGAATGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGAATTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAG  
AGTTGAGGACACGGCCTTGATTACTGTGCAAAAGTCAAGTGGGACCTACAGGGACTACTTCTACGGAGTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAAGGTCACCGTCTCCTCAG

#### VH PEP

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFRDVTMHWVVRQGPGLKLEWVSGISWNSDYIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTALYYCAKLSGTYRDFYGVVDVMWGQTTVTVSS

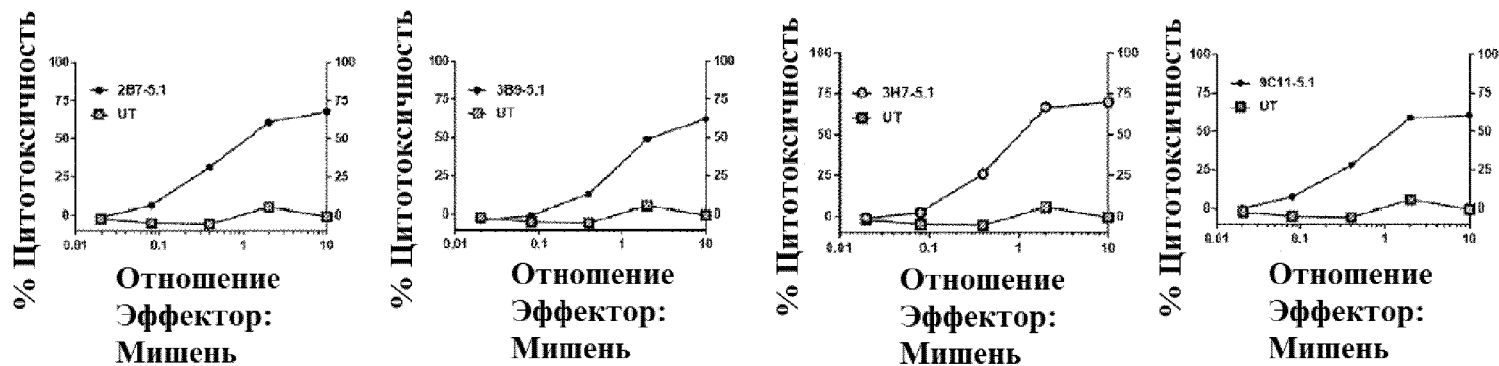
#### VK CDS

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCGCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAACTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCC  
CAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTACTG  
TCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAGAC

#### VK PEP

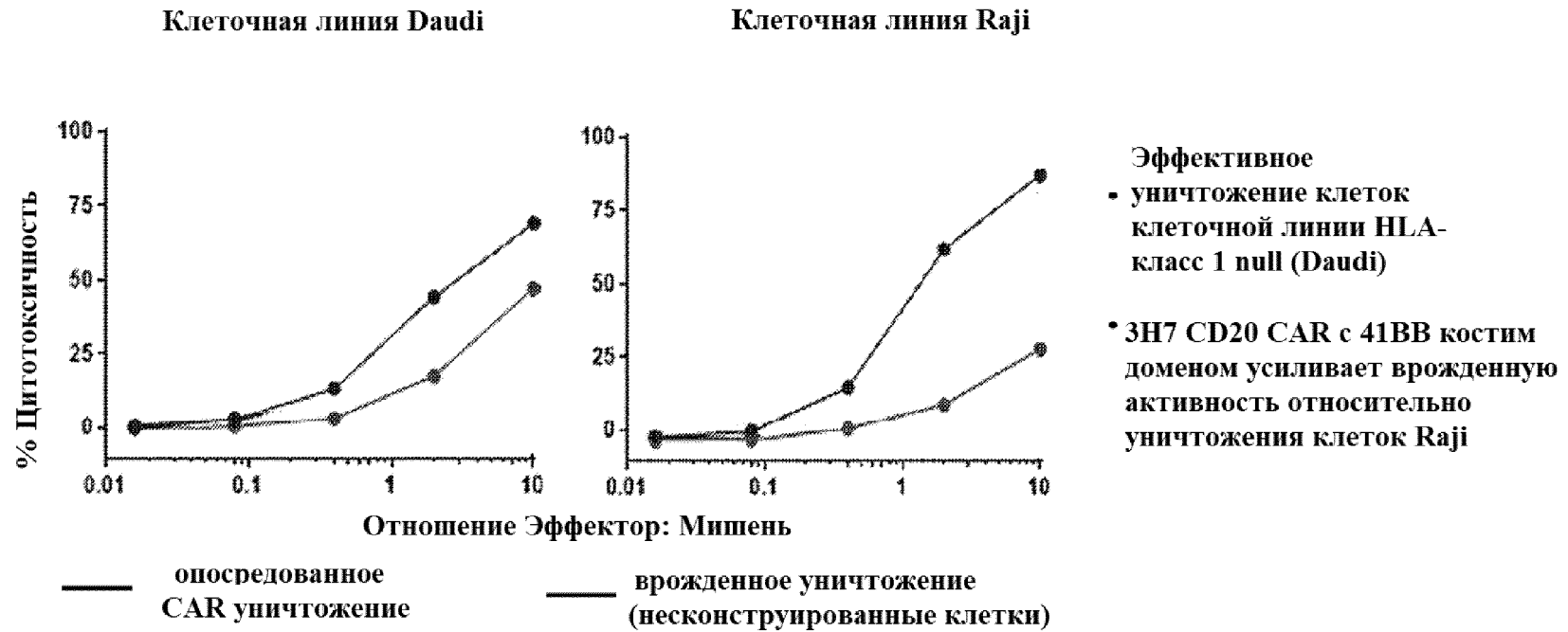
EIVLTQSPATLSLSPGERAALSCRASQSVSNYLAHWYLRQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQRNSNWPITFGGGTKVEIR

**Фиг. 3**  
**Индукция апоптоза в нормальных В-клетках клетками V $\delta$ 1,**  
**трансдуцированными различными CD20-специфическими конструкциями CAR**



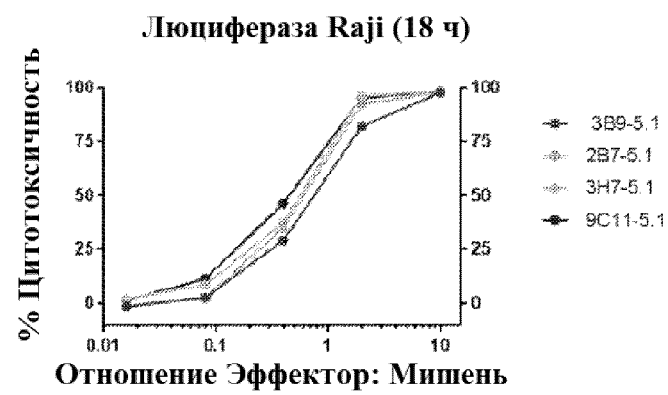
Фиг. 4

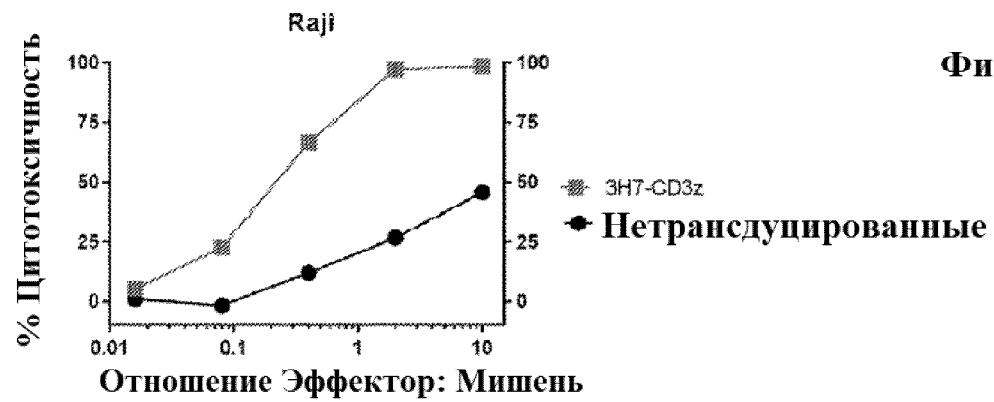
CD20-специфические CAR  $\gamma\delta$  T-клетки усилено уничтожают клетки клеточных линий лимфомы



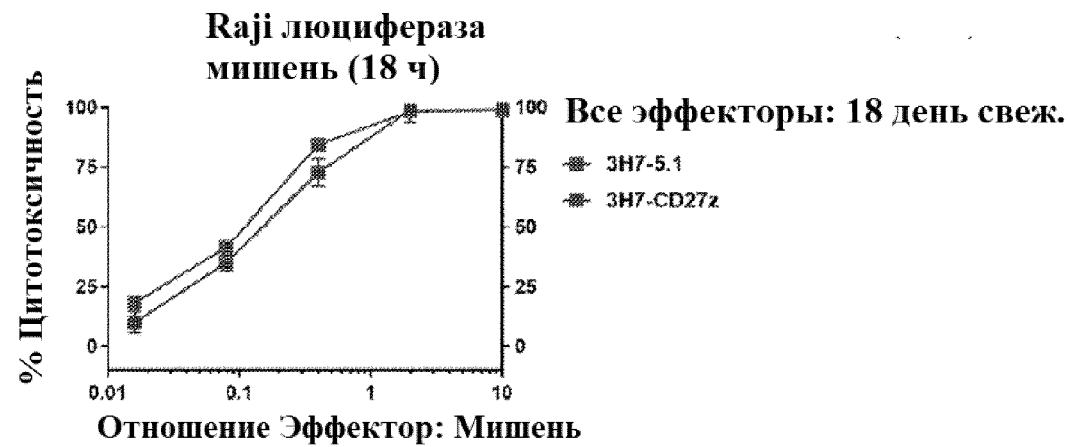


Фиг. 5

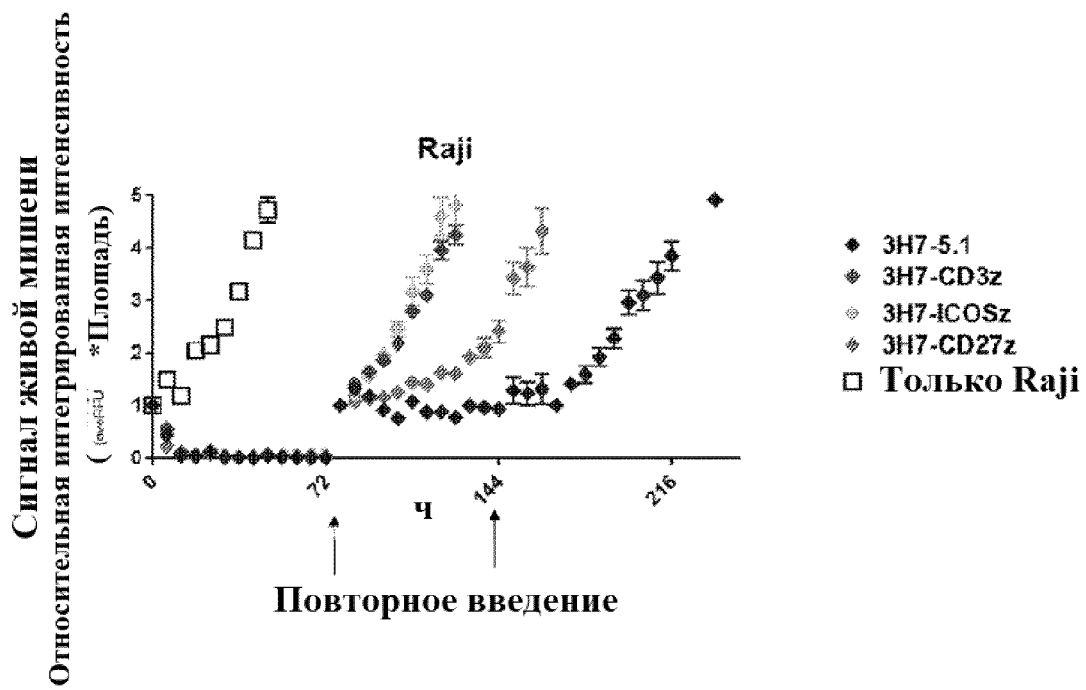




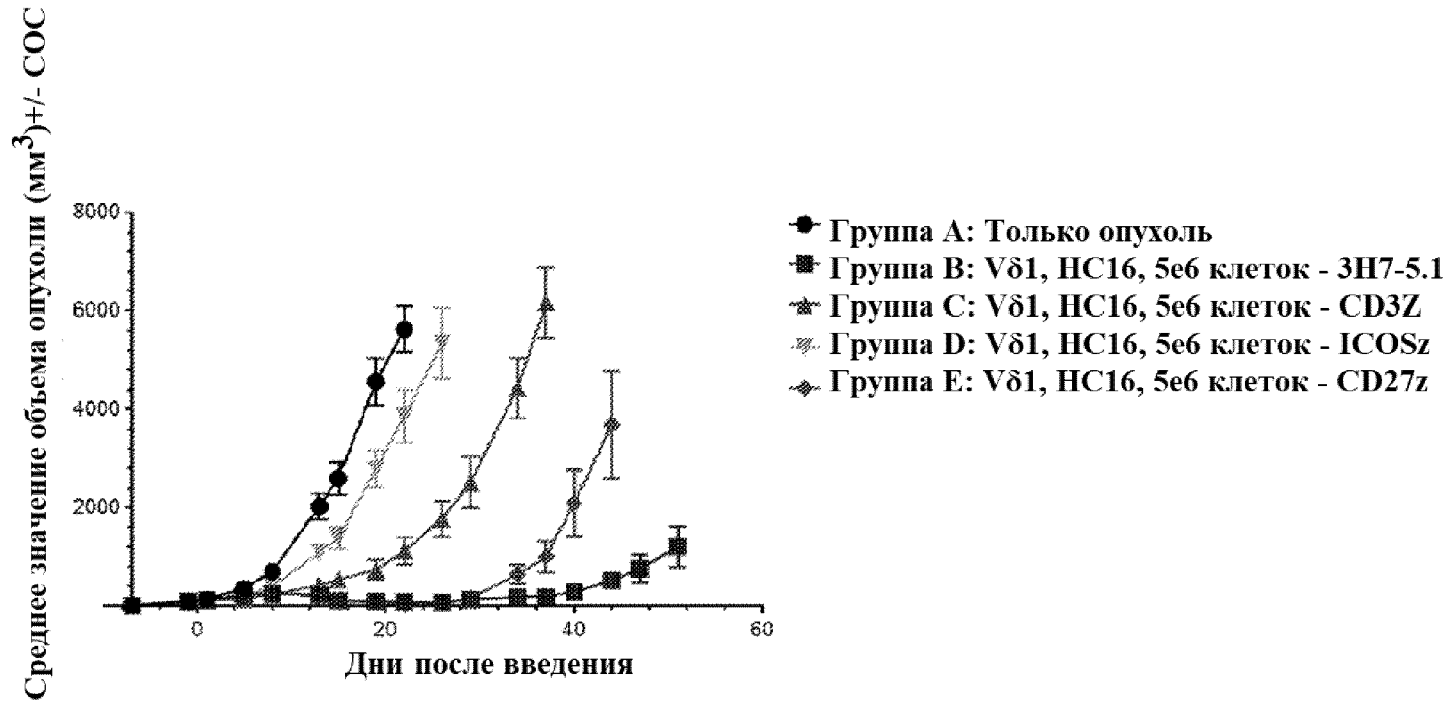
**Фиг. 6**

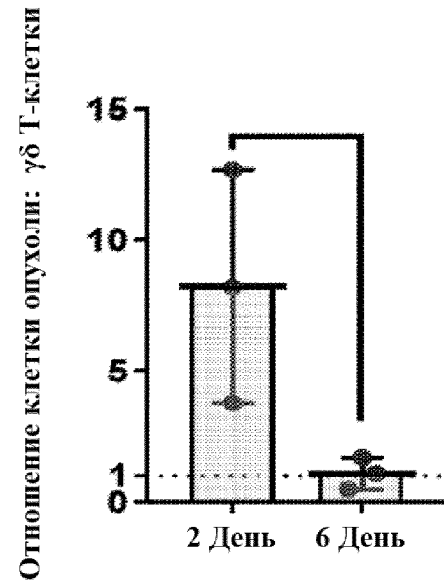
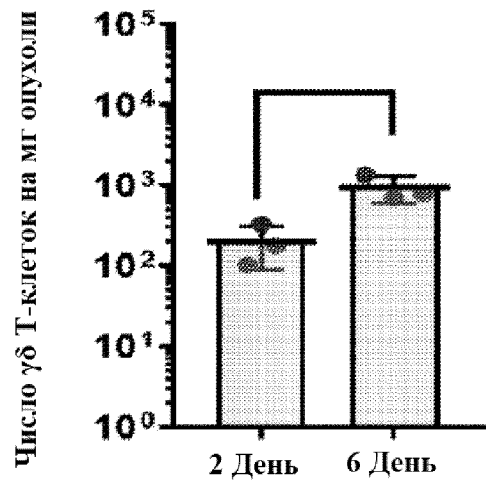


Фиг. 7



Фиг. 8

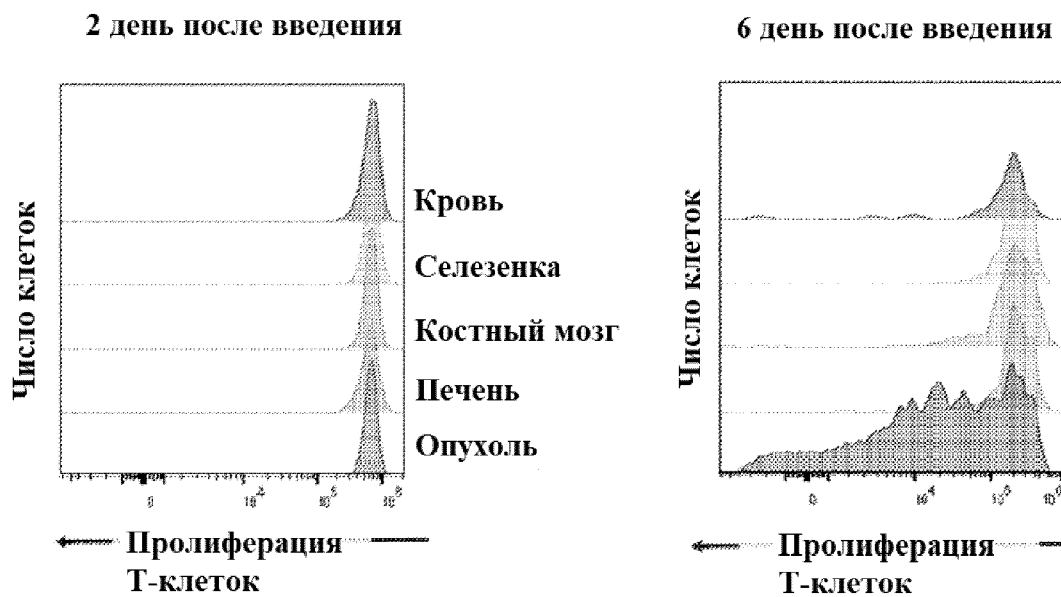




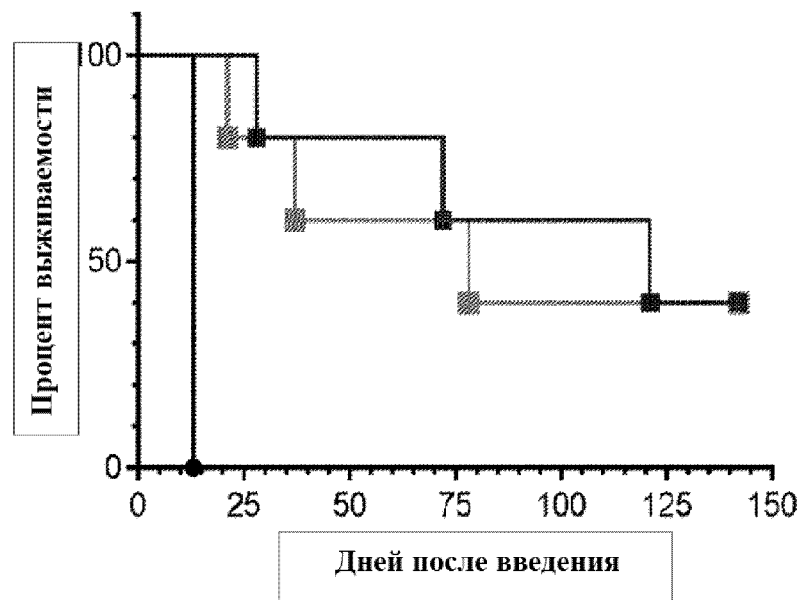
Фиг. 9

Фиг. 10

$\gamma\delta$  T-клетки пролиферируют в ответ на опухоль



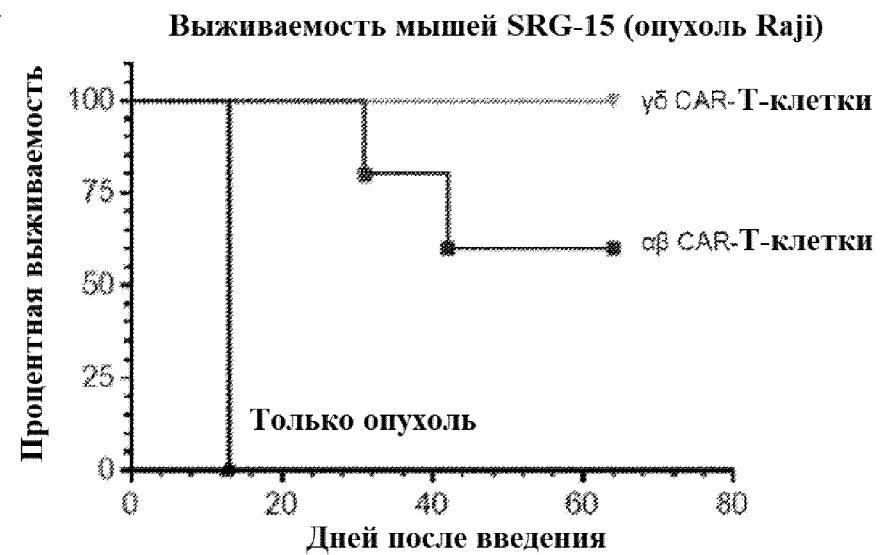
Фиг. 11



— Только опухоль — αβ CART (3H7-5.1) клетки — γδ CART (3H7-5.1) клетки

Фиг. 12

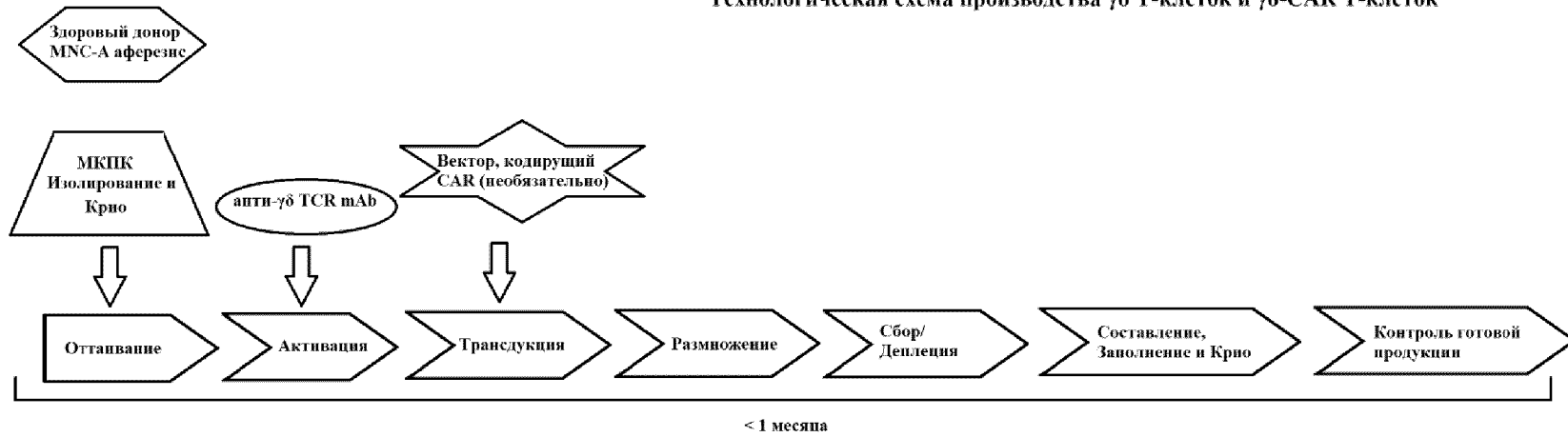
- \* Смерти в группе  $\alpha\beta$  CAR T-клеток из-за РТПХ
- \* Никаких РТПХ не наблюдалось у мышей, которым вводили  $\gamma\delta$  клетки
- 3H7-5.1 CAR конструкция



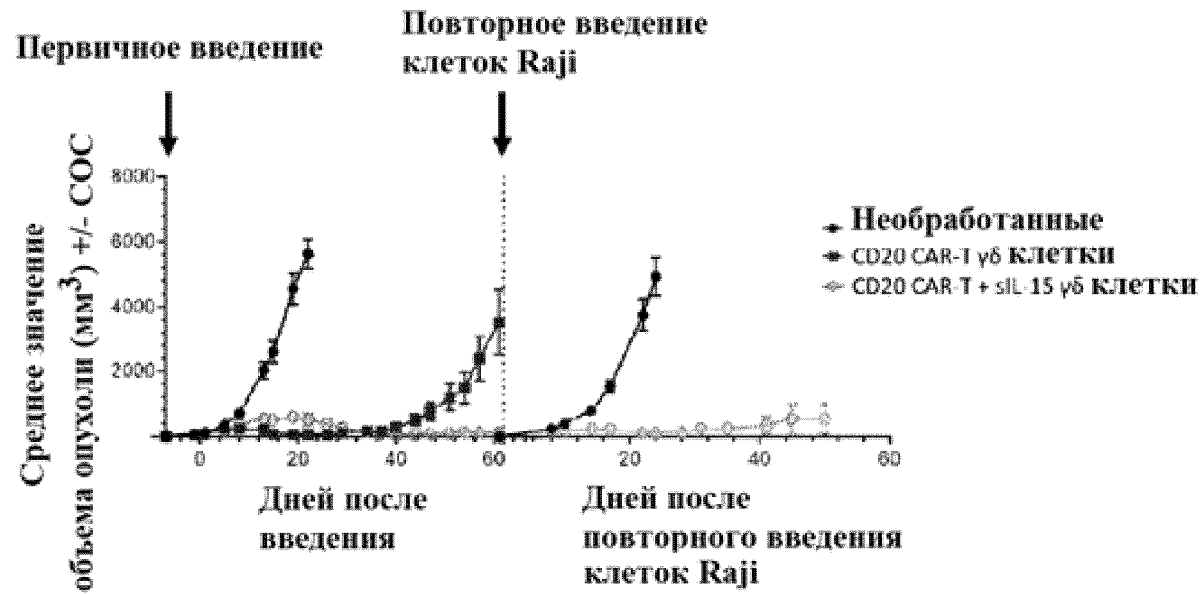


Фиг. 13

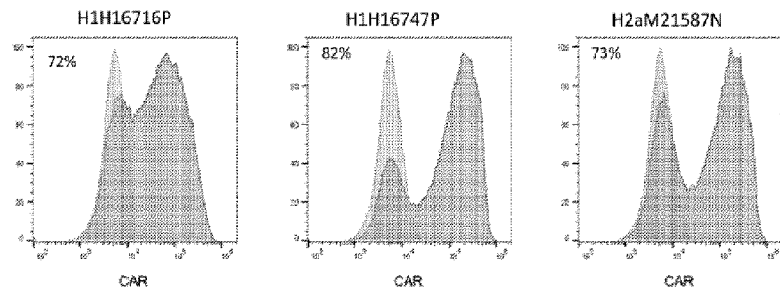
Технологическая схема производства  $\gamma\delta$  T-клеток и  $\gamma\delta$ -CAR T-клеток



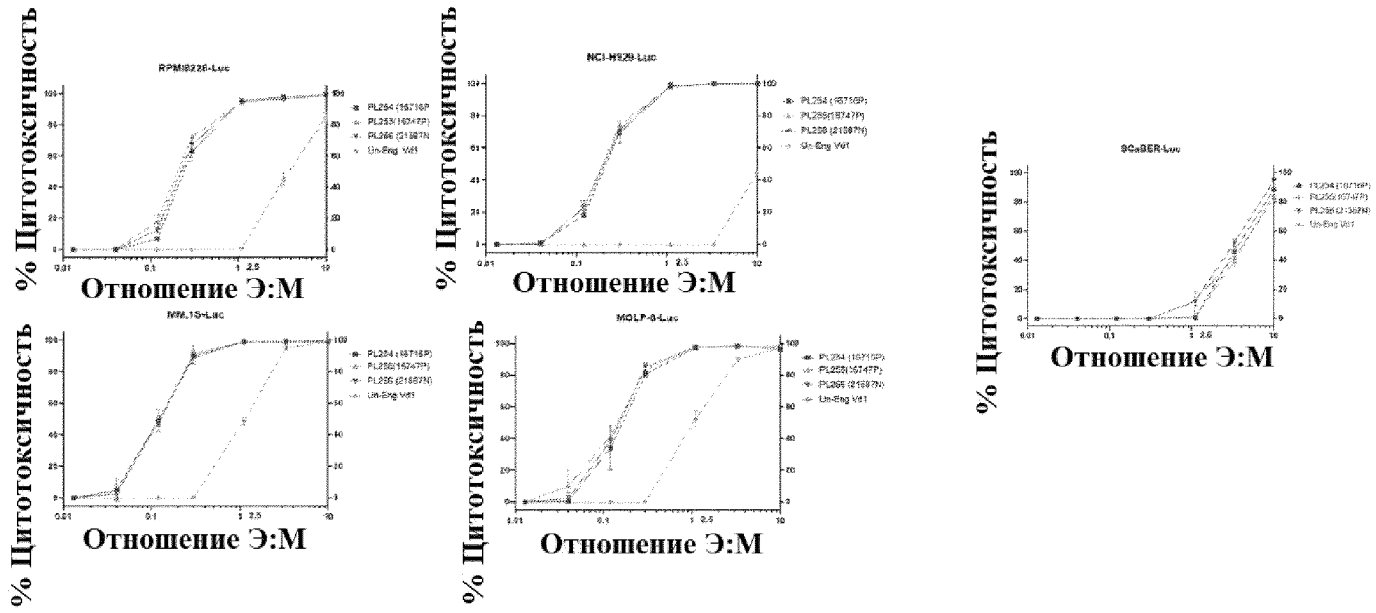
Фиг. 14



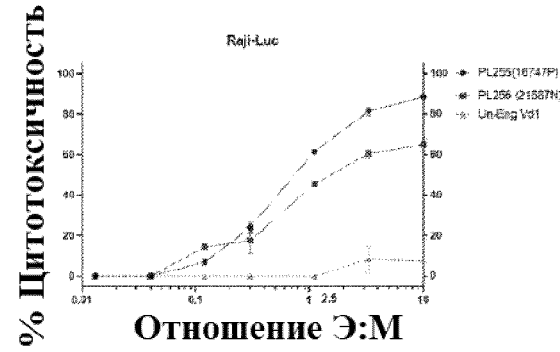
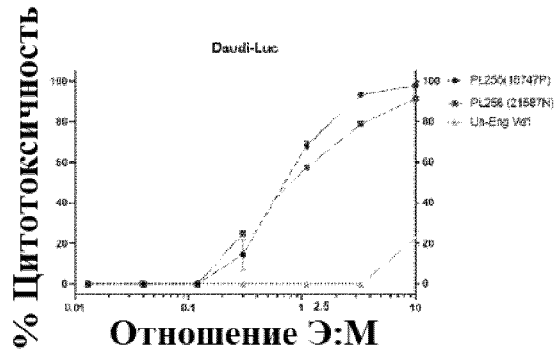
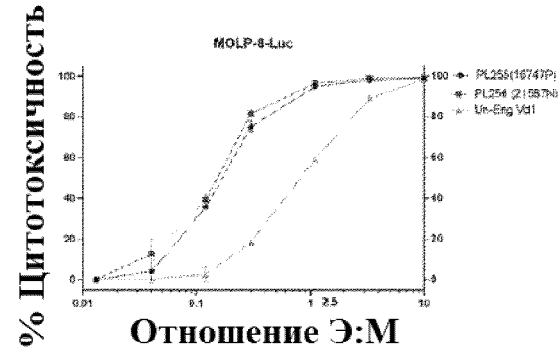
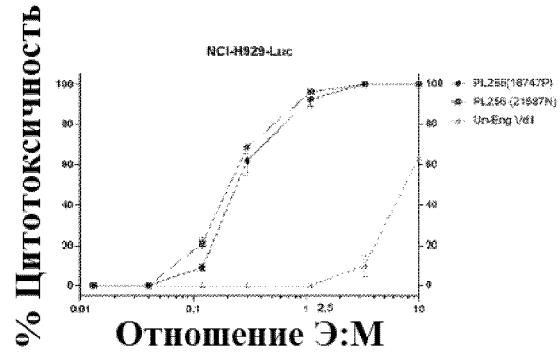
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

