

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202291616 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.08.05

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.11.25

(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ДЛЯ CD19 И CD22 И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/940,600

(72) Изобретатель:

(32) 2019.11.26

Энгельс Борис, Гимарэс Карла  
Патрисиа Пинто (US)

(33) US

(86) PCT/US2020/062304

(74) Представитель:

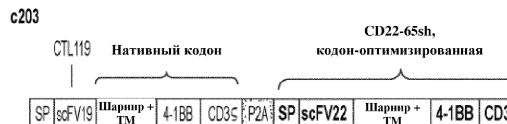
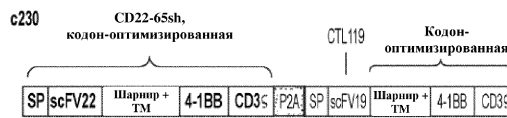
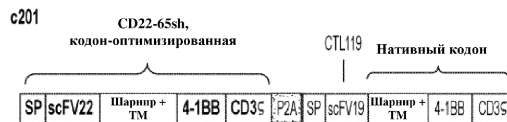
(87) WO 2021/108613 2021.06.03

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

НОВАРТИС АГ (CH)

(57) В изобретении предусмотрены композиции и способы лечения заболеваний, ассоциированных с экспрессией CD19 и/или CD22, например, посредством введения рекомбинантной Т-клетки или естественной киллерной клетки (NK), содержащей CAR для CD22 и CAR для CD19, описанные в данном документе. Настоящее изобретение также относится к молекулам CAR, специфическим в отношении CD22 и/или CD19, способам получения клетки, содержащей их, и векторов, кодирующих их.



A1

202291616

202291616

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574325EA/022

### ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ДЛЯ CD19 И CD22 И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ И ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/940600, поданной 26 ноября 2019 года, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Перечень последовательностей, содержащийся в файле под названием "PAT058691-WO-РСТ SQL\_ST25", который составляет 182837 байт (измерено в операционной системе MS-Windows) и был создан 24 ноября 2020 года, подан с данным документом и включен в данный документ посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение в целом относится к применению Т-клеток или естественных киллерных клеток (NK), сконструированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего домен, связывающий белок кластера дифференцировки 19 (CD19), и/или домен, связывающий белок кластера дифференцировки 22 (CD22), для лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CD19 и/или CD22.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Многих пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями невозможно вылечить с помощью стандартной терапии. Кроме того, традиционные варианты лечения часто характеризуются тяжелыми побочными эффектами. Были предприняты попытки в области противораковой иммунотерапии, однако некоторые ограничения осложняют достижение клинической эффективности. Хотя были идентифицированы сотни так называемых опухолевых антигенов, они, как правило, являются собственными и, таким образом, являются недостаточно иммуногенными. Кроме того, опухоли используют несколько механизмов, чтобы сделать себя неблагоприятными для инициирования и распространения иммунной атаки.

Последние разработки с использованием терапии аутологичными Т-клетками, модифицированными химерным антигенным рецептором (CAR) (CART), которая заключается в перенаправлении Т-клеток на подходящую молекулу клеточной поверхности на раковых клетках, как например, в В-клеточных злокачественных новообразованиях, показывают многообещающие результаты в использовании силы иммунной системы для лечения В-клеточных злокачественных новообразований и других форм рака (см., например, Sadelain et al., *Cancer Discovery* 3:388-398 (2013)). Клинические результаты для CART19, полученных от мышинных (т. е. "CTL019"), продемонстрировали перспективность в формировании полной ремиссии у пациентов, страдающих CLL, а также ALL у детей (см., например, Kalos et al., *Sci Transl Med* 3:95ra73 (2011), Porter et al.,

NEJM 365:725-733 (2011), Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)). Помимо способности химерного антигенного рецептора на генетически модифицированных Т-клетках распознавать и разрушать клетки-мишени, успешное терапевтическое средство Т-клеточной терапии должно обладать способностью к пролиферации и персистенции в течение продолжительного времени, чтобы контролировать рецидив лейкоза. Непостоянное качество Т-клеток, обусловленное анергией, подавлением или истощением, будет влиять на функциональные характеристики CAR-трансформированных Т-клеток, над которыми практикующие специалисты в данной области техники в настоящее время имеют ограниченный контроль. Для обеспечения эффективности, CAR-трансформированные Т-клетки пациента должны персистировать и поддерживать способность к пролиферации в ответ на когнатный антиген.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении раскрыты, среди прочего, новые молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы химерного антигенного рецептора (CAR), которые содержат первый CAR, предусматривающий CAR для CD22, и второй CAR, предусматривающий CAR для CD19, например, двойные CAR, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD22 содержит антигенсвязывающий домен для CD22 и первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит антигенсвязывающий домен для CD19 и второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и/или второй первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления молекулы CAR, раскрытой в данном документе, молекула CAR содержит две идентичные полипептидные последовательности, например, первого и второго трансмембранного домена; первого и второго костимулирующего домена и/или первого и второго первичного сигнального домена, при этом полипептидные последовательности кодируются разными нуклеотидными последовательностями. Также в данном документе раскрыты способы применения указанных молекул CAR. Кроме того, в данном документе раскрыты CAR, содержащие биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит антигенсвязывающий домен для CD22 и антигенсвязывающий домен для CD19, например, тандемные CAR, описанные в данном документе. Также раскрыты нуклеиновые кислоты, кодирующие композиции, клетки-хозяева, векторы, а также способы получения и применения.

#### Двойные CAR

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(а) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и/или второй первичный сигнальный домен,

где:

(i) первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты;

(ii) первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты; и/или

(iii) первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

В варианте осуществления первый CAR содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен и первый костимулирующий сигнальный домен. В варианте осуществления первый CAR содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен и первый первичный сигнальный домен. В варианте осуществления первый CAR содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен, первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен.

В варианте осуществления второй CAR содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен и второй костимулирующий сигнальный домен. В варианте осуществления второй CAR содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен и второй первичный сигнальный домен. В варианте осуществления второй CAR содержит второй антигенсвязывающий домен, который

связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен.

В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) из CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A или 3A; и/или одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) из CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A или 3A. В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC, CDR3 LC, содержащие аминокислотную последовательность под: (i) SEQ ID NO: 20, 21, 22, 28, 29 и 30 соответственно; (ii) SEQ ID NO: 23, 24, 22, 31, 32 и 33 соответственно; или (iii) SEQ ID NO: 25, 26, 27, 34, 32 и 30 соответственно.

В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности scFv для CD22, представленной в таблице 1A или 3A, например, SEQ ID NO: 50, 53 или 55. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, который содержит аминокислотную последовательность, с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью scFv для CD22, представленной в таблице 1A или 3A, например, SEQ ID NO: 50, 53 или 55. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, который содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD22, представленную в таблице 1A или 3A, например, SEQ ID NO: 50, 53 или 55.

В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, который кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью scFv для CD22, представленной в таблице 1A или 3A, например, SEQ ID NO: 49, 51, 52, 54, 56 или 57.

В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) из антигенсвязывающего домена для CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A, 3A или 5A; и/или одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей

комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) из антигенсвязывающего домена для CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A, 3A или 5A. В варианте осуществления CD19-связывающий домен содержит CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC, CDR3 LC, содержащие аминокислотную последовательность под: (i) SEQ ID NO: 35, 36, 39, 40, 41 и 42 соответственно; (ii) SEQ ID NO: 35, 37, 39, 40, 41 и 42 соответственно; или (iii) SEQ ID NO: 35, 38, 39, 40, 41 и 42 соответственно.

В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности scFv для CD19, представленной в таблицах 1A, 3A или 5A, например, SEQ ID NO: 44 или 47. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью scFv для CD19, представленной в таблицах 1A, 3A или 5A, например, SEQ ID NO: 44 или 47. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD19, представленную в таблицах 1A, 3A или 5A, например, SEQ ID NO: 44 или 47. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, кодируемый нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью scFv для CD19, представленной в таблицах 1A, 3A или 5A, например, SEQ ID NO: 43, 45, 46 или 48.

В варианте осуществления нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу CAR, раскрытую в данном документе, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый трансмембранный домен, отличается на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй трансмембранный домен. В варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый трансмембранный домен, отличается по меньшей мере 1 нуклеотидом, 10 нуклеотидами, 20 нуклеотидами, 30 нуклеотидами, 40 нуклеотидами, 50 нуклеотидами, 60 нуклеотидами, 70 нуклеотидами, 80 нуклеотидами, 90 нуклеотидами, 100 нуклеотидами, 150 нуклеотидами, 200 нуклеотидами или всеми нуклеотидами от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй трансмембранный домен.

В варианте осуществления нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу CAR, раскрытую в данном документе, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый костимулирующий сигнальный домен, отличается на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй костимулирующий сигнальный домен. В варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый

костимулирующий сигнальный домен, отличается по меньшей мере 1 нуклеотидом, 10 нуклеотидами, 20 нуклеотидами, 30 нуклеотидами, 40 нуклеотидами, 50 нуклеотидами, 60 нуклеотидами, 70 нуклеотидами, 80 нуклеотидами, 90 нуклеотидами, 100 нуклеотидами, 150 нуклеотидами, 200 нуклеотидами или всеми нуклеотидами от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй костимулирующий сигнальный домен.

В варианте осуществления нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу CAR, раскрытую в данном документе, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый первичный сигнальный домен, отличается на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй первичный сигнальный домен. В варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая первый первичный сигнальный домен, отличается по меньшей мере 1 нуклеотидом, 10 нуклеотидами, 20 нуклеотидами, 30 нуклеотидами, 40 нуклеотидами, 50 нуклеотидами, 60 нуклеотидами, 70 нуклеотидами, 80 нуклеотидами, 90 нуклеотидами, 100 нуклеотидами, 150 нуклеотидами, 200 нуклеотидами или всеми нуклеотидами от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй первичный сигнальный домен.

В одном аспекте последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу CAR, раскрытую в данном документе, молекула CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 11, 15 или 19 или нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

В одном аспекте молекула CAR, раскрытая в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или 16, аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью с ней.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(a) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и/или второй первичный сигнальный домен,

где:

(i) первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной

последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты;

(ii) первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты; и/или

(iii) первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

В одном аспекте первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

В другом аспекте в данном документе предусмотрена клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(a) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и/или второй первичный сигнальный домен,

где:

(i) первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в



молекуле нуклеиновой кислоты;

(ii) первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты; и/или

(iii) первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

В варианте осуществления клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку (например, CD3+, CD4+ или CD8+ Т-клетку) или NK-клетку. В варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека.

В одном аспекте в данном документе предусмотрен способ обеспечения противоопухолевого иммунитета, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей, например, экспрессирующей, молекулу CAR, раскрытую в данном документе, например, молекулу двойного CAR, раскрытую в данном документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание, ассоциированное с антигеном (например, CD19 и/или CD22), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей, например, экспрессирующей, молекулу CAR, раскрытую в данном документе, например, молекулу двойного CAR, раскрытую в данном документе.

#### Тандемные CAR

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен биспецифический антигенсвязывающий домен, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19.

В другом аспекте в данном документе предусмотрен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления биспецифического антигенсвязывающего домена, описанного в данном документе, например, CAR, содержащего биспецифический антигенсвязывающий домен, или нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, первый антигенсвязывающий домен может находиться выше (например, в N-концевой ориентации) второго антигенсвязывающего домена или первый антигенсвязывающий домен может находиться ниже (например, в C-концевой ориентации) второго антигенсвязывающего домена.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого антигенсвязывающего домена и вторых антигенсвязывающих доменов содержит scFv, например, переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит scFv, содержащий первый VH (VH1) и первый VL (VL1). В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен содержит scFv, содержащий второй VH (VH2) и второй VL (VL2).

В некоторых вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий домен имеет любую из следующих конфигураций от N-конца к C-концу: VL1-VH1-VH2-VL2; VH1-VL1-VH2-VL2; VL1-VH1-VL2-VH2; VH1-VL1-VL2-VH2, VH2-VL2-VL1-VH1; VL2-VH2-VL1-VH1; VH2-VL2-VH1-VL1 или VL2-VH2-VH1-VL1.

В одном аспекте CAR, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 и кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1. В другом аспекте CAR, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 и кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3.

В другом аспекте CAR, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 и кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 5.

В другом аспекте CAR, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 и кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7.

В другом аспекте CAR, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 и кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9.

В аспекте настоящего изобретения предусмотрен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу CAR, раскрытую в данном документе, нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифический антигенсвязывающий домен, раскрытый в данном документе, или нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, раскрытый в данном документе.

В другом аспекте в данном документе предусмотрена фармацевтическая

композиция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR, раскрытую в данном документе, или фармацевтическая композиция, содержащая молекулу CAR, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит вспомогательное вещество, носитель, разбавитель и/или стабилизатор.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая биспецифический антигенсвязывающий домен, раскрытый в данном документе, CAR, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, раскрытый в данном документе, или нуклеиновую кислоту CAR, кодирующую биспецифический антигенсвязывающий домен, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит вспомогательное вещество, носитель, разбавитель и/или стабилизатор.

В одном аспекте в данном документе предусмотрен способ обеспечения противоопухолевого иммунитета, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей, например, экспрессирующей, CAR, раскрытый в данном документе, например, tandemный CAR, раскрытый в данном документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание, ассоциированное с антигеном (например, CD19 и/или CD22), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей, например, экспрессирующей, CAR, раскрытый в данном документе, например, tandemный CAR, раскрытый в данном документе.

Специалистам в данной области техники будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, или они будут способны установить такие эквиваленты посредством проведения только обычных экспериментов. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются нижеследующими пронумерованными вариантами осуществления.

#### Пронумерованные варианты осуществления

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(a) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен,

где:

(i) первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную

последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты;

(ii) первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты; и/или

(iii) первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1, где первый CAR содержит:

первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен и первый костимулирующий сигнальный домен;

первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен и первый первичный сигнальный домен или

первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен, первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или 2, где второй CAR содержит:

второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен и второй костимулирующий сигнальный домен;

второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен и второй первичный сигнальный домен или

второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антигенсвязывающий домен для CD22 содержит:

одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) из CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A или 3A; и/или

одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A или 3A.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 4, где антигенсвязывающий домен для CD22 содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC из CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблице 1A, 2A или 3A; и/или CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC из CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A или 3A.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 4 или 5, где антигенсвязывающий домен для CD22 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую CDR1 LC, под SEQ ID NO: 28, 31 или 34, CDR2 LC под SEQ ID NO: 29 или 32; CDR3 LC под SEQ ID NO: 30 или 33 и/или CDR1 HC под SEQ ID NO: 20, 23 или 25, CDR2 HC под SEQ ID NO: 21, 24 или 26; CDR3 HC под SEQ ID NO: 22 или 27.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 4-6, где антигенсвязывающий домен для CD22 (например, scFv) содержит вариабельную область легкой цепи (VL) CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A или 3A; и/или вариабельную область тяжелой цепи (VH) CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A или 3A.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 7, где антигенсвязывающий домен для CD22 содержит область VL,

содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности области VL для CD22, представленной в таблице 1A или 3A;

содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью области VL для CD22, представленной в таблице 1A или 3A; или

которая кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность области VL для CD22, представленную в таблице 1A или 3A.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 7 или 8, где антигенсвязывающий домен для CD22 содержит область VH,

содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере

одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности области VH для CD22, представленной в таблице 1A или 3A;

содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с областью VH для CD22, представленной в таблице 1A или 3A; или

которая кодируется нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность области VH для CD22, представленную в таблице 1A или 3A.

10. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 7-9, где области VH и VL антигенсвязывающего домена для CD22 соединены линкером, например, линкером, с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с линкером, описанным в данном документе, например, линкером, раскрытым в таблице 4A.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, который:

содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности scFv для CD22, представленной в таблице 1A или 3A, например, SEQ ID NO: 50;

содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью scFv для CD22, представленной в таблице 1A или 3A, например, SEQ ID NO: 50;

содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD22, представленную в таблице 1A или 3A, например, SEQ ID NO: 50; или

кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью scFv для CD22, представленной в таблице 1A или 3A, например, SEQ ID NO: 49 или 51.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антигенсвязывающий домен для CD19 содержит:

одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) из CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A, 3A или 5A; и/или

одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в

таблицах 1А, 2А, 3А или 5А.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 12, где антигенсвязывающий домен для CD19 содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC из CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблице 1А или 2А; и/или CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC из CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблице 1А, 2А или 3А.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 12 или 13, где антигенсвязывающий домен для CD19 содержит CDR1 LC под SEQ ID NO: 40, CDR2 LC под SEQ ID NO: 41 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 42 и/или CDR1 HC под SEQ ID NO: 35, CDR2 HC под SEQ ID NO: 36-38 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 39.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 12-14, где антигенсвязывающий домен для CD19 (например, scFv) содержит переменную область легкой цепи (VL) CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1А, 3А или 5А; и/или переменную область тяжелой цепи (VH) CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1А, 3А или 5А.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 15, где антигенсвязывающий домен для CD19 содержит область VL, содержащую:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности области VL для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А;

аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью области VL для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А; или

аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность области VL для CD19, представленную в таблицах 1А, 3А или 5А.

17. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 15 или 16, где антигенсвязывающий домен для CD19 содержит область VH, содержащую:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности области VH для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А;

аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью области VH для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А; или

аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность области VH для CD19, представленную в таблицах 1А, 3А или 5А.

18. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 15-17, где области VH и VL антигенсвязывающего домена для CD19 соединены линкером,

например, линкером с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с линкером, описанным в данном документе, например, линкером, раскрытым в таблице 4А.

19. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, который:

содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности scFv для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А, например, SEQ ID NO: 44;

содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью scFv для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А, например, SEQ ID NO: 44;

содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD19, представленную в таблицах 1А, 3А или 5А, например, SEQ ID NO: 44; или

кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью scFv для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А, например, SEQ ID NO: 43 или 48.

20. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 65.

21. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре, пять, шесть или семь модификаций (например, замен) в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 65.

22. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65.

23. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый трансмембранный домен, отличается на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй трансмембранный домен.

24. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый трансмембранный домен, отличается по меньшей мере 1 нуклеотидом, 10 нуклеотидами, 20 нуклеотидами, 30 нуклеотидами, 40 нуклеотидами, 50 нуклеотидами, 60 нуклеотидами, 70 нуклеотидами, 80 нуклеотидами, 90 нуклеотидами, 100 нуклеотидами, 150



нуклеотидами, 200 нуклеотидами или всеми нуклеотидами от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй трансмембранный домен.

25. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый трансмембранный домен, выбрана из последовательности, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 64 или 66.

26. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй трансмембранный домен, выбрана из последовательности, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 67 или 68.

27. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 70.

28. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять модификаций (например, замен) в аминокислотной последовательности под любым из SEQ ID NO: 70.

29. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 70.

30. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый костимулирующий сигнальный домен, отличается на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй костимулирующий сигнальный домен.

31. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый костимулирующий сигнальный домен, отличается по меньшей мере 1 нуклеотидом, 10 нуклеотидами, 20 нуклеотидами, 30 нуклеотидами, 40 нуклеотидами, 50 нуклеотидами, 60 нуклеотидами, 70 нуклеотидами, 80 нуклеотидами, 90 нуклеотидами, 100 нуклеотидами, 120 нуклеотидами или всеми нуклеотидами от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй костимулирующий сигнальный домен.

32. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый

костимулирующий домен, выбрана из последовательности, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 69 или 72.

33. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй костимулирующий домен, выбрана из последовательности, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 71 или 73.

34. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 75.

35. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать модификаций (например, замен) в аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 75.

36. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75.

37. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый первичный сигнальный домен, отличается на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй первичный сигнальный домен.

38. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый первичный сигнальный домен, отличается по меньшей мере 1 нуклеотидом, 10 нуклеотидами, 20 нуклеотидами, 30 нуклеотидами, 40 нуклеотидами, 50 нуклеотидами, 60 нуклеотидами, 70 нуклеотидами, 80 нуклеотидами, 90 нуклеотидами, 100 нуклеотидами, 150 нуклеотидами, 200 нуклеотидами, 250 нуклеотидами, 300 нуклеотидами или всеми нуклеотидами от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй первичный сигнальный домен.

39. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый первичный сигнальный домен, выбрана из последовательности, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 74 или 77.

40. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй первичный

сигнальный домен, выбрана из последовательности, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 76 или 78.

41. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первый CAR и/или второй CAR содержат сигнальный пептид, например, пептид, содержащий отрезок из гидрофобных аминокислот, например, 5-16 остатков.

42. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 41, где сигнальный пептид выбран из сигнального пептида CD8-альфа, сигнального пептида интерлейкина 2, сигнального пептида человеческого альбумина, сигнального пептида человеческого химотрипсиногена, сигнального пептида человеческого трипсиногена-2 или других подобных сигнальных пептидов, раскрытых в Stern B. et al. "Improving mammalian cell factories: The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells." (2007).

43. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 41 или 42, где сигнальный пептид:

содержит сигнальный пептид, представленный в таблице 4A;

содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59 или

кодируется нуклеиновой кислотой под любым из SEQ ID NO: 58, 60, 61, 62 или 63 или нуклеиновой кислотой, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

44. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где молекула нуклеиновой кислоты содержит в направлении от 5' к 3' первый CAR, за которым следует второй CAR.

45. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-43, где молекула нуклеиновой кислоты содержит в направлении от 5' к 3' второй CAR, за которым следует первый CAR.

46. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая сайт расщепления протеазой (например, сайт расщепления T2A, P2A, E2A или F2A) или сайт внутренней посадки рибосомы.

47. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 46, где сайт расщепления протеазой представляет собой сайт P2A.

48. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 46 или 47, где сайт P2A содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 86; или нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 85 или 87.

49. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 46-48, где сайт расщепления протеазой или сайт внутренней посадки рибосомы располагаются между первым CAR и вторым CAR.

50. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 46-49, где сайт расщепления протеазой располагается таким образом, что клетка может

экспрессировать слитый белок, содержащий первый CAR и второй CAR, где необязательно слитый белок подвергается процессингу с получением двух пептидов посредством протеолитического расщепления.

51. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где молекула CAR содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 11 или нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

52. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где молекула CAR содержит первый CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней, и второй CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

53. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где молекула CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

54. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-50, где молекула CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 15 или нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

55. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-50 или 54, где молекула CAR содержит первый CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней, и второй CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

56. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-50, или 54, или 55, где молекула CAR кодируется нуклеиновой кислотой, кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

57. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-50, где молекула CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 19 или нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

58. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-50 или 57, где молекула CAR содержит первый CAR, содержащий аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 13 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней, и второй CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

59. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-50, или 57, или 58, где молекула CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

60. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит в ориентации от 5' к 3':

(a) первый CAR, содержащий первый сигнальный пептид; первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен;

(b) сайт расщепления протеазой P2A;

(c) второй CAR, содержащий второй сигнальный пептид; второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и второй первичный сигнальный домен,

где молекула CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 11 или нуклеиновой кислотой, кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12.

61. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит в ориентации от 5' к 3':

(a) второй CAR, содержащий второй сигнальный пептид; второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и второй первичный сигнальный домен;

(b) сайт расщепления протеазой P2A;

(c) первый CAR, содержащий первый сигнальный пептид; первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен,

где молекула CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 15 или нуклеиновой кислотой, кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

62. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит в ориентации от 5' к 3':

(a) первый CAR, содержащий первый сигнальный пептид; первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный

домен;

(b) сайт расщепления протеазой P2A;

(c) второй CAR, содержащий второй сигнальный пептид; второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и второй первичный сигнальный домен,

где молекула CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 19 или нуклеиновой кислотой, кодирующей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12.

63. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно содержащая промоторную последовательность, например, промотор EF1.

64. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый CAR, и нуклеотидная последовательность, кодирующая второй CAR, располагаются на одной конструкции нуклеиновой кислоты.

65. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 64, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый CAR, и нуклеиновая кислота, кодирующая второй CAR, располагаются на одном и том же векторе.

66. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих вариантов осуществления, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый CAR, и нуклеотидная последовательность, кодирующая второй CAR, располагаются на разных конструкциях нуклеиновой кислоты, например, нуклеотидная последовательность, кодирующая первый CAR, располагается на первой конструкции нуклеиновой кислоты, и нуклеотидная последовательность, кодирующая второй CAR, располагается на второй конструкции нуклеиновой кислоты.

67. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 66, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый CAR, располагается на первом векторе.

68. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 66, где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй CAR, располагается на втором векторе.

69. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая вирусный элемент, например, элемент вирусной упаковки.

70. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-69.

71. Вектор по варианту осуществления 70, где вектор выбран из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора.

72. Клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая вектор по варианту осуществления 70 или 71 или молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-69.

73. Клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(a) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен,

где:

(i) первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты;

(ii) первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты; и/или

(iii) первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 75 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

74. Клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(a) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен,

где:

(i) первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты;

(ii) первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты; и/или

(iii) первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, где необязательно нуклеотидная последовательность, которая кодирует первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

75. Клетка по варианту осуществления 74, где клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR.

76. Клетка по варианту осуществления 73 или 75, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-69 или вектор по варианту осуществления 70 или 71.

77. Клетка, содержащая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), которая содержит:

(a) первый CAR, содержащий первый сигнальный пептид; первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен;

(b) второй CAR, содержащий второй сигнальный пептид; второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и второй первичный сигнальный домен,

где молекула CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 11 или содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12.

78. Клетка, содержащая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR),



которая содержит:

(а) второй CAR, содержащий второй сигнальный пептид; второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и второй первичный сигнальный домен;

(b) первый CAR, содержащий первый сигнальный пептид; первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен,

где молекула CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 15 или содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

79. Клетка, содержащая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), которая содержит:

(а) первый CAR, содержащий первый сигнальный пептид; первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен;

(b) второй CAR, содержащий второй сигнальный пептид; второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и второй первичный сигнальный домен,

где молекула CAR кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 19 или содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12.

80. Клетка по любому из вариантов осуществления 72-79, где клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку (например, CD3+, CD4+ или CD8+ Т-клетку) или NK-клетку.

81. Клетка по варианту осуществления по любому из вариантов осуществления 72-80, где клетка представляет собой клетку человека.

82. Способ получения клетки (например, иммунной эффекторной клетки), включающий трансдуцирование иммунной эффекторной клетки, например, Т-клетки или NK-клетки, вектором по варианту осуществления 70 или 71.

83. Способ получения клетки (например, иммунной эффекторной клетки), включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-69 в иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или NK-клетку.

84. Способ получения популяции РНК-сконструированных клеток, включающий введение транскрибированной *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, где РНК содержит молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-69,

85. Биспецифический антигенсвязывающий домен, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19.

86. Биспецифический антигенсвязывающий домен по варианту осуществления 85,

где первый антигенсвязывающий домен может находиться выше (например, в N-концевой ориентации) второго антигенсвязывающего домена или первый антигенсвязывающий домен может находиться ниже (например, в C-концевой ориентации) второго антигенсвязывающего домена.

87. Биспецифический антигенсвязывающий домен по варианту осуществления 85 или 86, где каждый из первого антигенсвязывающего домена и вторых антигенсвязывающих доменов содержит scFv, например, вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH).

88. Биспецифический антигенсвязывающий домен по варианту осуществления 87, где VH может находиться выше или ниже VL.

89. Биспецифический антигенсвязывающий домен по варианту осуществления 87 или 88, где первый антигенсвязывающий домен содержит scFv, содержащий первый VH (VH1) и первый VL (VL1).

90. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 87-89, где второй антигенсвязывающий домен содержит scFv, содержащий второй VH (VH2) и второй VL (VL2).

91. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 87-90, где первый антигенсвязывающий домен организован таким образом, что VH1 располагается выше VL1.

92. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 87-90, где первый антигенсвязывающий домен организован таким образом, что VL1 располагается выше VH1.

93. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 87-92, где второй антигенсвязывающий домен организован таким образом, что VH2 располагается выше VL2.

94. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 87-92, где второй антигенсвязывающий домен организован таким образом, что VL2 располагается выше VH2.

95. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 87-90 или 92-93, где антигенсвязывающий домен имеет следующую конфигурацию от N-конца к C-концу: VL1-VH1-VH2-VL2.

96. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 87-90, или 91, или 93, где антигенсвязывающий домен имеет следующую конфигурацию от N-конца к C-концу: VH1-VL1-VH2-VL2.

97. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 87-90, 92 или 94, где антигенсвязывающий домен имеет следующую конфигурацию от N-конца к C-концу: VL1-VH1-VL2-VH2.

98. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 87-90, 91 или 94, где антигенсвязывающий домен имеет следующую конфигурацию от N-конца к C-концу: VH1-VL1-VL2-VH2.

99. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 85-98, где линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом.

100. Биспецифический антигенсвязывающий домен по варианту осуществления 99, где линкер располагается между scFv первого антигенсвязывающего домена и scFv второго антигенсвязывающего домена.

101. Биспецифический антигенсвязывающий домен по варианту осуществления 100, где линкер располагается между

VH1 и VH2, если конструкция имеет конфигурацию VL1-VH1-VH2-VL2;

VL1 и VH2, если конструкция имеет конфигурацию VH1-VL1-VH2-VL2;

VH1 и VL2, если конструкция имеет конфигурацию VL1-VH1-VL2-VH2; или

VL1 и VL2, если конструкция имеет конфигурацию VH1-VL1-VL2-VH2.

102. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 99-101, где линкер является достаточно длинным, чтобы избежать ошибочного спаривания между доменами двух scFv.

103. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 99-102, где линкер представляет собой линкер, описанный в данном документе, например, линкер, представленный в таблице 1А или 4А.

104. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 99-103, где линкер представляет собой линкер (Gly4-Ser)<sub>n</sub>, где n составляет 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

105. Биспецифический антигенсвязывающий домен по варианту осуществления 104, где n=1, например, линкер имеет аминокислотную последовательность Gly4-Ser.

106. Биспецифический антигенсвязывающий домен по варианту осуществления 104, где n=3, например, SEQ ID NO: 82.

107. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 99-103, где линкер содержит аминокислотную последовательность LAEAAAK, например, SEQ ID NO: 80.

108. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 99-107, где линкер располагается между VL и VH в scFv первого антигенсвязывающего домена, например, линкер, описанный в данном документе.

109. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 99-108, где линкер располагается между VL и VH в scFv второго антигенсвязывающего домена, например, линкер, описанный в данном документе.

110. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 99-109, содержащий аминокислотную последовательность антигенсвязывающего домена, представленного в таблице 1А или 4А, например, под любым из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 44, 47, 53 или 55, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

112. Биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 99-109, который кодируется нуклеотидной последовательностью антигенсвязывающего домена, представленного в таблице 1А или 4а, например, под любым из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 43, 45, 46, 52, 54, 56 или 57, или нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

113. Биспецифический химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 85-112.

114. Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая биспецифический химерный антигенный рецептор (CAR), где конструкция нуклеиновой кислоты кодирует биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 85-112.

115. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит:

первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен.

116. CAR по варианту осуществления 115, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 86-112.

117. CAR по варианту осуществления 115 или 116, содержащий:

биспецифический антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен и костимулирующий сигнальный домен;

биспецифический антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен и первичный сигнальный домен или

биспецифический антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен; костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен.

118. CAR по любому из вариантов осуществления 115-117, где CAR содержит трансмембранный домен, где трансмембранный домен выбран из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137 или CD154.

119. CAR по варианту осуществления 118, где биспецифический антигенсвязывающий домен соединен с трансмембранным доменом с помощью шарнирной области, например, шарнирной области, описанной в данном документе.

120. CAR по любому из вариантов осуществления 115-119, где CAR содержит костимулирующий домен, где костимулирующий домен содержит сигнальный домен OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) или 4-1BB (CD137).

121. CAR по любому из вариантов осуществления 115-120, где костимулирующий

домен содержит сигнальный домен 4-1BB.

122. CAR по любому из вариантов осуществления 115-121, где CAR содержит первичный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен CD3-дзета.

123. CAR по любому из вариантов осуществления 115-122, где CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в таблице 4A, например, под любым из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

124. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;

(ii) второй антигенсвязывающий домен расположен выше первого антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

125. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;

(ii) первый антигенсвязывающий домен расположен выше второго антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

126. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен,

который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;

(ii) первый антигенсвязывающий домен расположен выше второго антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

127. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;

(ii) первый антигенсвязывающий домен расположен выше второго антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

128. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;

(ii) первый антигенсвязывающий домен расположен выше второго антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

129. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор (нуклеиновая кислота CAR), где CAR содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит:

первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен.

130. Нуклеиновая кислота CAR по варианту осуществления 129, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 86-112.

131. Нуклеиновая кислота CAR по варианту осуществления 129 или 130, где CAR содержит:

биспецифический антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен и костимулирующий сигнальный домен;

биспецифический антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен и первичный сигнальный домен или

биспецифический антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен; костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен.

132. Нуклеиновая кислота CAR по любому из вариантов осуществления 129-131, где CAR содержит трансмембранный домен, где трансмембранный домен выбран из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137 или CD154.

133. Нуклеиновая кислота CAR по варианту осуществления 132, где биспецифический антигенсвязывающий домен соединен с трансмембранным доменом с помощью шарнирной области, например, шарнирной области, описанной в данном документе.

134. Нуклеиновая кислота CAR по любому из вариантов осуществления 129-133, где CAR содержит костимулирующий домен, где костимулирующий домен содержит сигнальный домен OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) или 4-1BB (CD137).

135. Нуклеиновая кислота CAR по варианту осуществления 134, где костимулирующий домен содержит сигнальный домен 4-1BB.

136. Нуклеиновая кислота CAR по любому из вариантов осуществления 129-135, где CAR содержит первичный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен CD3-дзета.

137. Нуклеиновая кислота CAR по любому из вариантов осуществления 129-136,

содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в таблице 4А, например, под любым из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9, или нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

138. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор (нуклеиновая кислота CAR), где CAR содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;

(ii) второй антигенсвязывающий домен расположен выше первого антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

139. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор (нуклеиновая кислота CAR), где CAR содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;

(ii) первый антигенсвязывающий домен расположен выше второго антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

140. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор (нуклеиновая кислота CAR), где CAR содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;



(ii) первый антигенсвязывающий домен расположен выше второго антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

141. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор (нуклеиновая кислота CAR), где CAR содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;

(ii) первый антигенсвязывающий домен расположен выше второго антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или последовательность с по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

142. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор (нуклеиновая кислота CAR), где CAR содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, где:

(i) каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов представляет собой scFv;

(ii) первый антигенсвязывающий домен расположен выше второго антигенсвязывающего домена; и

(iii) линкер располагается между первым антигенсвязывающим доменом и вторым антигенсвязывающим доменом,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и первичный сигнальный домен, и

где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

143. Вектор, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен по

любому из вариантов осуществления 85-112, CAR по любому из вариантов осуществления 113 или 115-128 или нуклеиновую кислоту CAR по любому из варианта осуществления 114 или 129-142.

144. Клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 85-112, CAR по любому из вариантов осуществления 113 или 115-128, нуклеиновую кислоту CAR по любому из вариантов осуществления 114 или 129-142 или вектор по варианту осуществления 143.

145. Клетка, содержащая химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, содержащий:

первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19,

где CAR содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и/или первичный сигнальный домен.

146. Клетка по варианту осуществления 145, содержащая CAR по любому из вариантов осуществления 116-123.

147. Способ получения клетки (например, иммунной эффекторной клетки), включающий:

трансдуцирование иммунной эффекторной клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, вектором по варианту осуществления 143 или

введение молекулы нуклеиновой кислоты CAR по любому из вариантов осуществления 129-142 в иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или НК-клетку.

148. Фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR по любому из вариантов осуществления 1-69, биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 85-112, CAR по любому из вариантов осуществления 113 или 115-128 или нуклеиновую кислоту CAR по любому из вариантов осуществления 114 или 129-142, где необязательно фармацевтическая композиция содержит вспомогательное вещество, носитель, разбавитель и/или стабилизатор.

149. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей, например, экспрессирующей, нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR по любому из вариантов осуществления 1-69, биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 85-112, CAR по любому из вариантов осуществления 113 или 115-128 или нуклеиновую кислоту CAR по любому из вариантов осуществления 114 или 129-142.

150. Клетка, например, популяция иммунных эффекторных клеток, содержащая, например, экспрессирующая, нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR по любому из вариантов осуществления 1-69, биспецифический антигенсвязывающий домен

по любому из вариантов осуществления 85-112, CAR по любому из вариантов осуществления 113 или 115-128 или нуклеиновую кислоту CAR по любому из вариантов осуществления 114 или 129-142, для применения в способе обеспечения противоопухолевого иммунитета для субъекта.

151. Способ по варианту осуществления 149 или применение по варианту осуществления 150, где клетка представляет собой Т-клетку или NK-клетку.

152. Способ по варианту осуществления 149 или 151 или применение по варианту осуществления 150 или 151, где клетка представляет собой аутологичную клетку или аллогенную клетку.

153. Способ по варианту осуществления 149 или применение по варианту осуществления 150, где субъект представляет собой человека.

154. Способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание, ассоциированное с антигеном (например, CD19 и/или CD22), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей, например, экспрессирующей, нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR по любому из вариантов осуществления 1-69, биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 85-112, CAR по любому из вариантов осуществления 113 или 115-128 или нуклеиновую кислоту CAR по любому из вариантов осуществления 114 или 129-142.

155. Клетка, например, популяция иммунных эффекторных клеток, содержащая, например, экспрессирующая, нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR по любому из вариантов осуществления 1-69, биспецифический антигенсвязывающий домен по любому из вариантов осуществления 85-112, CAR по любому из вариантов осуществления 113 или 115-128 или нуклеиновую кислоту CAR по любому из вариантов осуществления 114 или 129-142, для применения в способе лечения субъекта, у которого имеется заболевание, ассоциированное с антигеном (например, CD19 и/или CD22).

156. Способ по варианту осуществления 154 или применение по варианту осуществления 155, где клетка представляет собой Т-клетку или NK-клетку.

157. Способ по варианту осуществления 154 или 155 или применение по варианту осуществления 154 или 155, где клетка представляет собой аутологичную клетку или аллогенную клетку.

158. Способ по варианту осуществления 154 или применение по варианту осуществления 155, где субъект представляет собой человека.

159. Способ по любому из вариантов осуществления 154 или 155-158 или применение по любому из вариантов осуществления 155-158, где заболевание, ассоциированное CD19 и/или CD22, выбрано из пролиферативного заболевания, например, рака или злокачественного новообразования, предракового состояния, например, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома или предлейкоза, или не связанного с раком показания, ассоциированного с экспрессией CD19 и/или CD22.

160. Способ или применение по варианту осуществления 159, где заболевание

представляет собой рак, например, гематологический рак.

161. Способ по любому из вариантов осуществления 154 или 155-160 или применение по любому из вариантов осуществления 155-160, где заболевание представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

162. Способ или применение по варианту осуществления 160 или 161, где гематологический рак выбран из острого миелоидного лейкоза (AML), В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (BALL), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (SLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического миелогенного лейкоза (CML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной лимфомы, крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественного лимфопролиферативного состояния, лимфомы MALT, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии или миелодиспластического синдрома, миелолипролиферативного новообразования, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, плазмобластной лимфомы, новообразования из плазмцитоподобных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, предлейкоза или их комбинации.

163. Способ по любому из вариантов осуществления 154 или 155-162 или применение по любому из вариантов осуществления 155-162, дополнительно включающие введение субъекту средства, которое

повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу CAR;

уменьшает тяжесть одного или нескольких побочных эффектов, ассоциированных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR; или

осуществляет лечение заболевания, ассоциированного с CD19 и/или CD22.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1А-1С** представлены схематические изображения конструкций двойного CAR, раскрытых в данном документе. Конструкции двойного CAR включают CAR для CD22 и CAR для CD19. На **фиг. 1А** показана конструкция двойного CAR, где от N-конца к С-концу расположены CAR для CD22, а затем CAR для CD19. На **фиг. 1В** показана конструкция другого двойного CAR, где от N-конца к С-концу расположены CAR для CD22, а затем CAR для CD19. На **фиг. 1С** показана конструкция двойного CAR, где от N-конца к С-концу расположены CAR для CD19, а затем CAR для CD22.

На **фиг. 2** представлено схематическое изображение конструкций тандемного CAR для CD19/CD22 по настоящему изобретению. Каждый тандемный CAR содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, содержащий антигенсвязывающий домен для CD19 и антигенсвязывающий домен для CD22.

На **фиг. 3А-3Д** показана активность *in vitro* Т-клеток с тандемным и двойным CAR, нацеливающимся на CD19 и CD22. На **фиг. 3А** представлен график, изображающий цитолитическую активность (уничтожение клеток) различных конструкций в отношении

CD22-отрицательной линии клеток ALL (CD22KO Nalm6-люцифераза). На **фиг. 3B** представлен график, изображающий цитолитическую активность (уничтожение клеток) различных конструкций в отношении CD19-отрицательной линии клеток ALL (CD19KO Nalm6-люцифераза). На **фиг. 3C-3D** представлены графики, показывающие продуцирование цитокина IFN $\gamma$ , обусловленное различными конструкциями CAR, в ответ на целевые клетки, экспрессирующие CD22 и/или CD19.

На **фиг. 4A-4B** показана активность *in vivo* Т-клеток с тандемным и двойным CAR, нацеливающимся на CD19 и CD22, на ксенотрансплантатной модели рецидива В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. На **фиг. 4A** представлен график, показывающий суммарный поток (среднюю биолюминесценцию) для всех групп обработки. На **фиг. 4B** представлен график, изображающий кинетические показатели размножения различных CAR-Т-клеток.

На **фиг. 5A-5C** показан анализ посредством проточной цитометрии процентной доли CAR19+, CAR22+ и двойных положительных CAR-Т-клеток, нацеливаемых на CD19 и CD22, полученных с помощью процесса активации. На **фиг. 5A** и **фиг. 5B** изображены результаты для производственного процесса в малых масштабах через 72 ч после сбора и через 144 ч после сбора соответственно. На **фиг. 5C** изображены результаты производственного процесса в крупных масштабах.

На **фиг. 6A-6B** показана активность *in vivo* Т-клеток с моно- и двойным CAR, нацеливающимся на CD19 и/или CD22, на ксенотрансплантатной модели В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. На **фиг. 6A** представлен график, показывающий суммарный поток (среднюю биолюминесценцию) для всех групп обработки. На **фиг. 6B** показано прямое сравнение групп, получавших дозу  $0,3 \times 10^6$  ( $0,3e6$ ). На **фиг. 6C** представлен график, изображающий кинетические показатели размножения различных CAR-Т-клеток, показанных в виде числа CAR+ клеток на 20 мкл крови (число CAR-Т-клеток, nCARtot).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Определения

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое общеизвестно специалисту средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Форма единственного числа относится к одному или более чем одному (т. е. по меньшей мере одному) грамматическому объекту настоящей заявки. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или более одного элементов.

Подразумевается, что термин "приблизительно" в отношении измеряемого значения, такого как количество, временной промежуток и т. п., охватывает вариации на  $\pm 20\%$ , или в некоторых случаях на  $\pm 10\%$ , или в некоторых случаях на  $\pm 5\%$ , или в некоторых случаях на  $\pm 1\%$ , или в некоторых случаях на  $\pm 0,1\%$  от указанного значения, поскольку такие вариации являются допустимыми для осуществления раскрытых способов.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к тем солям, которые с медицинской точки зрения являются подходящими для применения в контакте с тканями субъектов без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т. п. и соответствуют разумному отношению польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, Berge et al. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в *J. Pharmaceutical Sciences* (1977) 66:1-19.

Термин "химерный антигенный рецептор", "CAR" или "молекула CAR" относится к набору полипептидов, как правило, в простейших вариантах осуществления двум, которые, находясь в иммунной эффекторной клетке, наделяют клетку специфичностью в отношении целевой клетки, как правило, раковой клетки, и генерированием внутриклеточного сигнала. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый в данном документе "внутриклеточным сигнальным доменом"), содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, определенных в данном документе ниже. В некоторых аспектах полипептиды из набора являются смежными друг с другом, например, находятся в одной и той же полипептидной цепи, например образуют химерный слитый белок. В некоторых вариантах осуществления полипептиды из набора не являются смежными друг с другом, например, находятся в разных полипептидных цепях. В некоторых вариантах осуществления набор полипептидов включает димеризационный переключатель, который при наличии димеризующей молекулы может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В одном аспекте стимулирующая молекула представляет собой дзета-цепь, ассоциированную с T-клеточным рецепторным комплексом. В одном аспекте цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, определенной ниже. В одном аспекте костимулирующая молекула выбрана из костимулирующих молекул, описанных в данном документе, например, 4-1BB (т. е. CD137), CD27 и/или CD28. В одном аспекте CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два

функциональных сигнальных домена, полученных из одной или нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит необязательную лидерную последовательность на аминоконце (N-конце) слитого белка CAR. В одном аспекте CAR дополнительно содержит лидерную последовательность на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, где лидерная последовательность необязательно отщепляется от антигенсвязывающего домена (например, scFv) в ходе клеточного процессинга и локализации CAR в клеточной мембране.

Термин "сигнальный домен" относится к функциональной части белка, которая действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути, образуя вторичные мессенджеры или функционируя в качестве эффекторов путем ответа на такие мессенджеры.

Используемый в данном документе термин "CD19" относится к белку кластера дифференцировки 19, который представляет собой антигенную детерминанту, выявляемую на лейкозных клетках-предшественниках. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот человека и мышинных можно найти в общедоступной базе данных, такой как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотную последовательность CD19 человека можно найти в UniProt/Swiss-Prot под номером доступа P15391, а последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CD19 человека, можно найти под номером доступа NM\_001178098. CD19 экспрессируется на клетках большинства форм рака из В-клеточной линии дифференцировки, включая, например, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и неходжкинскую лимфому. Другие клетки, экспрессирующие CD19, представлены ниже в определении "заболевания, ассоциированного с экспрессией CD19". Он также представляет собой ранний маркер предшественников В-клеток. См., например, Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997). В одном аспекте антигенсвязывающая часть CART распознает и связывает антиген в пределах внеклеточного домена белка CD19. В одном аспекте белок CD19 экспрессируется на раковой клетке. Используемый в данном документе "CD19" включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и сплайс-варианты полноразмерного CD19 дикого типа.

Используемый в данном документе термин "CD22" относится к антигенной детерминанте, которую, как известно, можно выявить на лейкозных клетках-предшественниках. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот человека и мышинных можно найти в общедоступной базе данных,

такой как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотные последовательности изоформ 1-5 CD22 человека можно найти под номерами доступа NP 001762.2, NP 001172028.1, NP 001172029.1, NP 001172030.1 и NP 001265346.1 соответственно, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую варианты 1-5 CD22 человека, можно найти под номерами доступа NM 001771.3, NM 001185099.1, NM 001185100.1, NM 001185101.1 и NM 001278417.1 соответственно. В одном аспекте антигенсвязывающая часть CAR распознает и связывает антиген в пределах внеклеточного домена белка CD22. В одном аспекте белок CD22 экспрессируется на раковой клетке. Используемый в данном документе "CD22" включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и сплайс-варианты полноразмерного CD22 дикого типа.

Используемый в данном документе термин "связывающий домен" (например, "CD22-связывающий домен") относится к белку, например, к цепи иммуноглобулина или ее фрагменту, содержащему по меньшей мере одну последовательность переменного домена иммуноглобулина. Термин "связывающий домен" (также называемый в данном документе "молекулой антитела") охватывает антитела и фрагменты антител. В варианте осуществления молекула антитела представляет собой молекулу полиспецифического антитела, например, она содержит совокупность последовательностей переменных доменов иммуноглобулина, где последовательность первого переменного домена иммуноглобулина из совокупности характеризуется специфичностью связывания с первым эпитопом, а последовательность второго переменного домена иммуноглобулина из совокупности характеризуется специфичностью связывания со вторым эпитопом. В варианте осуществления молекула полиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело характеризуется специфичностью в отношении не более чем двух антигенов. Молекула биспецифического антитела отличается тем, что содержит первую последовательность переменного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания с первым эпитопом, и вторую последовательность переменного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания со вторым эпитопом.

Термин "фрагмент антитела" относится к по меньшей мере одной части антитела, которая сохраняет способность специфически взаимодействовать (например, посредством связывания, стерического препятствования, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена. Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>-, Fv-фрагменты, scFv-фрагменты антител, Fv, стабилизированные дисульфидными связями (sdFv), Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (либо VL, либо VH), VHH-домены верблюдовых, полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, таких как бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, и выделенный CDR или другие эпитопсвязывающие фрагменты антитела. Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть включены в состав однодоменных антител, максиантител, миниантител, нанотел,



внутриклеточных антител, диател, триател, тетрател, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть привиты на остовы на основе полипептидов, таких как фибронектин III типа (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны миниантитела на основе полипептида фибронектина). Термин "scFv" относится к слитому белку, который содержит по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, где переменные области легкой и тяжелой цепей связаны друг с другом, например, посредством синтетического линкера, например короткого гибкого полипептидного линкера, и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, и где scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, то используемый в данном документе scFv может содержать переменные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-конца и C-конца полипептида, при этом scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Используемый в данном документе термин "определяющая комплементарность область" или "CDR" относится к последовательностям из аминокислот в пределах переменных областей антитела, которые придают антигенную специфичность и аффинность связывания. Точные границы аминокислотной последовательности указанной CDR могут быть определены с использованием любой из ряда широко известных схем, в том числе описанных Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273, 927-948 (схема нумерации "Chothia") и нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003) (схема нумерации "IMGT"). Например, для классических форматов, согласно Kabat, аминокислотные остатки CDR в переменном домене тяжелой цепи (VH) нумеруются 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в переменном домене легкой цепи (VL) нумеруются 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно Chothia аминокислоты CDR в VH нумеруются 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL нумеруются 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). Комбинируя определения CDR согласно Kabat и Chothia, CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH человека и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL человека. Согласно IMGT, аминокислотные остатки CDR в VH нумеруются примерно 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) и 93-102 (CDR3), и аминокислотные остатки CDR в VL нумеруются примерно 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) и 89-97 (CDR3) (нумерация в соответствии с "IMGT"). Согласно IMGT, CDR-области антитела можно определить с применением программы IMGT/DomainGap Align.

Часть CAR по настоящему изобретению, содержащая антитело или фрагмент этого

антитела, может существовать в различных формах, в которых антигенсвязывающий домен экспрессируется в виде части непрерывной полипептидной цепи, в том числе, например, в виде фрагмента однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного антитела (scFv), гуманизированного антитела или биспецифического антитела (Harlow et al., 1999, в: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, в: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен композиции CAR по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте CAR содержит фрагмент антитела, который содержит scFv.

Термин "тяжелая цепь антитела" относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях, и которая обычно определяет класс, к которому принадлежит антитело.

Термин "легкая цепь антитела" относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Легкие каппа- ( $\kappa$ -) и лямбда- ( $\lambda$ -) цепи относятся к двум основным изотипам легких цепей антител.

Термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, создаваемому с использованием технологии рекомбинантных ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое в бактериофаговой или дрожжевой системе экспрессии. Термин также следует истолковывать как означающий антитело, которое было создано в результате синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, при этом данная молекула ДНК экспрессирует белок антитела или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где последовательность ДНК или аминокислотная последовательность были получены с использованием технологии рекомбинантных ДНК или аминокислотных последовательностей, доступной и широко известной в данной области техники.

Термин "антиген" или "Ag" относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может предусматривать продуцирование антител либо активацию специфических иммунокомпетентных клеток или как то, так и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, в том числе практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты или частичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, вследствие этого кодирует "антиген", как этот термин используется в данном документе. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не должен кодироваться исключительно полноразмерной последовательностью нуклеиновой кислоты гена. Очевидно, что настоящее изобретение охватывает без ограничения

применение частичных последовательностей нуклеиновой кислоты более чем одного гена, и что эти последовательности нуклеиновой кислоты расположены в различных комбинациях для кодирования полипептидов, которые вызывают требуемый иммунный ответ. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген вообще не обязательно должен кодироваться "геном". Очевидно, что антиген может быть образован, синтезирован или может быть получен из биологического образца, или может представлять собой макромолекулу, отличную от полипептида. Такой биологический образец может включать без ограничения образец ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

Термин "противораковый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, в том числе без ограничения, например, в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения числа раковых клеток, уменьшения числа метастазов, увеличения ожидаемой продолжительности жизни, уменьшения пролиферации раковых клеток, уменьшения выживаемости раковых клеток или уменьшения тяжести различных физиологических симптомов, ассоциированных с раковым состоянием. "Противораковый эффект" также может проявляться в виде способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по настоящему изобретению в первую очередь предупреждать появление рака. Термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, в том числе без ограничения, например, в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения числа опухолевых клеток, уменьшения пролиферации опухолевых клеток или уменьшения выживаемости опухолевых клеток. Термин "аутологичный" относится к любому материалу, полученному от того же индивидуума, которому он позднее должен быть повторно введен.

Термин "аллогенный" относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивидуум, которому данный материал вводят. Считается, что два или более индивидуумов являются аллогенными по отношению друг к другу, если их гены в одном или нескольких локусах не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенные материалы от индивидуумов одного и того же вида могут быть достаточно непохожими генетически, чтобы происходило их антигенное взаимодействие.

Термин "ксеногенный" относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

Термин "комбинация" относится либо к фиксированной комбинации в виде единичной дозированной формы, либо к комбинированному ведению, где соединение по настоящему изобретению и партнера по комбинации (например, другое лекарственное средство, которое поясняется ниже, также называемое "терапевтическим средством" или "совместно применяемым средством") можно вводить независимо в одно и то же время или по отдельности в пределах промежутков времени, в частности, если эти промежутки времени обеспечивают партнерам по комбинации возможность проявления кооперативного, например, синергического, эффекта. Единичные компоненты могут быть

упакованы в виде набора или по отдельности. Один или оба компонента (например, порошки или жидкости) могут быть восстановлены или разбавлены до необходимой дозы перед введением. Подразумевается, что используемые в данном документе термины "совместное введение" или "комбинированное введение" и т. п. охватывают введение выбранного партнера по комбинации одному субъекту, нуждающемуся в этом (например, пациенту), и предполагается, что они включают схемы лечения, в которых средства необязательно вводят одним и тем же путем введения или в одно и то же время. Используемый в данном документе термин "фармацевтическая комбинация" означает продукт, который получают в результате смешивания или комбинирования более чем одного терапевтического средства, и включает фиксированные и нефиксированные комбинации терапевтических средств. Термин "фиксированная комбинация" означает, что оба терапевтические средства, например, соединение по настоящему изобретению и партнер по комбинации, вводятся пациенту одновременно в виде единого объекта или дозы. Термин "нефиксированная комбинация" означает, что оба терапевтические средства, например, соединение по настоящему изобретению и партнер по комбинации, вводятся пациенту как отдельные объекты одновременно, параллельно или последовательно без конкретных ограничений по времени, при этом такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также применяется в отношении "коктейльной терапии", например введения трех или более терапевтических средств.

Термин "рак" относится к заболеванию, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части организма. Примеры различных форм рака описаны в данном документе и включают без ограничения рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого и т. п. Термины "опухоль" и "рак" используются в данном документе взаимозаменяемо, например, оба термина охватывают солидные опухоли и опухоли жидких тканей. Используемый в данном документе термин "рак" или "опухоль" включает предзлокачественные, а также злокачественные формы рака и опухоли.

Используемая в данном документе фраза "заболевание, ассоциированное с экспрессией CD22" включает без ограничения заболевание, ассоциированное с экспрессией CD22 (например, CD22 дикого типа или мутантного CD22), или состояние, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют или в какое-либо время экспрессировали CD22 (например, CD22 дикого типа или мутантный CD22), в том числе, например, пролиферативное заболевание, такое как рак или злокачественное новообразование, или предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз; или не связанное с раком показание, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют CD22 (например, CD22 дикого типа

или мутантный CD22). Во избежание неоднозначности, заболевание, ассоциированное с экспрессией CD22, может включать состояние, ассоциированное с клетками, которые в настоящее время не экспрессируют CD22, например, по причине того, что экспрессия CD22 была подавлена, например, вследствие лечения молекулой, нацеливающейся на CD22, например, CAR для CD22, но которые в свое время экспрессировали CD22. В одном аспекте рак, ассоциированный с экспрессией CD22, представляет собой гематологический рак. В одном аспекте гематологический рак включает без ограничения AML, миелодиспластический синдром, ALL, волосатоклеточный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, новообразование из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток и т. п. Дополнительное заболевание, ассоциированное с экспрессией CD22, включает без ограничения, например, атипичные и/или неклассические формы рака, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, ассоциированные с экспрессией CD22. Также могут быть включены не связанные с раком показания, ассоциированные с экспрессией CD22. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CD22, экспрессируют или в какой-либо момент времени экспрессировали мРНК, кодирующую CD22. В варианте осуществления клетки, экспрессирующие CD22, продуцируют белок CD22 (например, дикого типа или мутантный), и при этом белок CD22 может присутствовать на нормальных уровнях или сниженных уровнях. В варианте осуществления клетки, экспрессирующие CD22, в один момент времени продуцировали белок CD22 на выявляемых уровнях, а затем фактически не продуцировали белок CD22 на выявляемых уровнях.

Фраза "заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19" охватывает без ограничения заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19 (например, CD19 дикого типа или мутантного CD19), или состояние, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют или в какое-либо время экспрессировали CD19 (например, CD19 дикого типа или мутантный CD19), в том числе, например, пролиферативные заболевания, такие как рак или злокачественное новообразование, или предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз; или не связанное с раком показание, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют CD19. Во избежание неоднозначности, заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19, может включать состояние, ассоциированное с клетками, которые в настоящее время не экспрессируют CD19, например по причине того, что экспрессия CD19 была подавлена, например, вследствие лечения молекулой, нацеливающейся на CD19, например, CAR для CD19, но которые в свое время экспрессировали CD19. В одном аспекте рак, ассоциированный с экспрессией CD19, представляет собой гематологический рак. В одном аспекте гематологический рак представляет собой лейкоз или лимфому. В одном аспекте рак, ассоциированный с экспрессией CD19, включает формы рака и злокачественные новообразования, в том числе без ограничения, например, один или несколько форм острого лейкоза, в том числе без ограничения, например, острый В-

клеточный лимфобластный лейкоз (BALL), острый Т-клеточный лимфоидный лейкоз (TALL), острый лимфобластный лейкоз (ALL); один или несколько форм хронического лейкоза, в том числе без ограничения, например, хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический лимфоидный лейкоз (CLL). Дополнительные формы рака или гематологические состояния, ассоциированные с экспрессией CD19, включают без ограничения, например, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмцитоподобных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и "предлейкоз", который представляет собой разнообразную группу гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и т. п. Кроме того, заболевания, ассоциированные с экспрессией CD19, включают без ограничения, например, атипичные и/или неклассические формы рака, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, ассоциированные с экспрессией CD19. Не связанные с раком показания, ассоциированные с экспрессией CD19, включают без ограничения, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанку), воспалительные нарушения (аллергию и астму) и трансплантацию. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CD19, экспрессируют или в какой-либо момент времени экспрессировали мРНК, кодирующую CD19. В варианте осуществления клетки, экспрессирующие CD19, продуцируют белок CD19 (например, дикого типа или мутантный), и при этом белок CD19 может присутствовать на нормальных уровнях или сниженных уровнях. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие CD19, в один момент времени продуцировали белок CD19 на выявляемых уровнях, а затем фактически не продуцировали белок CD19 на выявляемых уровнях.

Если не указано иное, используемые в данном документе термины "предупредить", "осуществление предупреждения" и "предупреждение" относятся к действию, которое происходит перед тем, как субъект начнет страдать от состояния, или рецидивом состояния. Предупреждение не обязательно приводит к полному предупреждению состояния; данным термином охватываются частичное предупреждение или снижение состояния или симптома состояния или снижение риска развития состояния.

Используемое в данном документе "вводимый в комбинации" означает, что два (или более) различных средства лечения доставляют субъекту во время периода, когда субъект страдает нарушением, например, два или более средства лечения доставляют

после того, как у субъекта было диагностировано нарушение, и перед тем, как нарушение будет излечено или устранено или лечение будет прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго, так что имеет место перекрывание с точки зрения введения. Это иногда обозначается в данном документе как "одновременная" или "параллельная" доставка. В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается перед началом доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго средства лечения, или второе средство лечения снижает интенсивность симптомов в большей степени, чем наблюдалось бы при введении второго средства лечения в отсутствие первого средства лечения, или аналогичная ситуация наблюдается с первым средством лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка является такой, при которой снижение интенсивности симптома или другого параметра, связанного с нарушением, является более значительным, чем наблюдалось бы при доставке одного средства лечения в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или превышающим аддитивный. Доставка может быть такой, что эффект от первого доставленного средства для лечения все еще поддается выявлению при доставке второго. В одном варианте осуществления клетку, экспрессирующую CAR, вводят в дозе и/или согласно графику введения доз, описанному в данном документе, и ингибитор В-клеток или средство, которое усиливает активность клетки, экспрессирующей CAR для CD19, вводят в дозе и/или согласно графику введения доз, описанному в данном документе.

Используемый в данном документе термин "полученный из" указывает на взаимосвязь между первой и второй молекулой. В целом он относится к структурному сходству между первой молекулой и второй молекулой и не подразумевает или не включает ограничения процесса или источника в отношении первой молекулы, которая получена из второй молекулы. Например, в случае внутриклеточного сигнального домена, который получен из молекулы CD3-дзета, внутриклеточный сигнальный домен сохраняет структуру CD3-дзета в достаточной мере для того, чтобы характеризоваться необходимой функцией, а именно способностью генерировать сигнал в подходящих условиях. Это не подразумевает или не включает ограничения в отношении конкретного процесса получения внутриклеточного сигнального домена, например, это не означает, что для получения внутриклеточного сигнального домена нужно начинать с последовательности CD3-дзета и удалять нежелательную последовательность или вводить мутации для получения внутриклеточного сигнального домена.

Термин "консервативные модификации последовательности" относится к аминокислотным модификациям, которые не оказывают значительного влияния на характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего

аминокислотную последовательность, или не изменяют их в значительной степени. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены в антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в CAR по настоящему изобретению можно заменить другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененный CAR можно протестировать с использованием функциональных анализов, описанных в данном документе.

Термин "стимуляция" относится к первичному ответу, индуцируемому связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3 или CAR) со своим когнатным лигандом (или опухолевым антигеном в случае CAR), за счет чего опосредуется событие передачи сигнала, такое как, без ограничения, передача сигнала через комплекс TCR/CD3 или передача сигнала через соответствующий рецептор NK или сигнальные домены CAR. Стимуляция может опосредовать изменение экспрессии определенных молекул.

Термин "стимулирующая молекула" относится к молекуле, экспрессируемой иммунной клеткой, например, Т-клеткой, NK-клеткой, В-клеткой, которая обеспечивает цитоплазматическую(-ие) сигнальную(-ые) последовательность(-и), регулируемую(-ие) активацию иммунной клетки стимулирующим образом по меньшей мере в некотором аспекте сигнального пути иммунной клетки. В одном аспекте сигнал является первичным сигналом, который инициируется, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, нагруженной пептидом, и который приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, в том числе без ограничения пролиферации, активации, дифференцировки и т. п. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также называемая "первичным сигнальным доменом"), которая действует стимулирующим образом, может содержать сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры цитоплазматической сигнальной последовательности, содержащей ITAM, которая



является особенно применимой в настоящем изобретении, включают без ограничения последовательности, полученные из CD3-дзета, общей гамма-цепи FcR (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12. В конкретном CAR по настоящему изобретению внутриклеточный сигнальный домен в любом одном или нескольких CAR по настоящему изобретению содержит внутриклеточную сигнальную последовательность, например, первичную сигнальную последовательность CD3-дзета. В конкретном CAR по настоящему изобретению первичная сигнальная последовательность CD3-дзета представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 96, или эквивалентные остатки от биологического вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.

Термин "антигенпрезентирующая клетка" или "APC" относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (например, В-клетка, дендритная клетка и т. п.), которая представляет чужеродный антиген в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на своей поверхности. Т-клетки могут распознавать эти комплексы с помощью своих Т-клеточных рецепторов (TCR). APC процессируют антигены и презентуют их Т-клеткам.

"Иммунная эффекторная клетка", как этот термин используется в данном документе, относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, например, способствуя иммунному эффекторному ответу. Примеры иммунных эффекторных клеток включают Т-клетки, например, альфа/бета-Т-клетки и гамма/дельта-Т-клетки, В-клетки, естественные киллерные клетки (NK), естественные киллерные Т-клетки (NK-Т), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения.

"Иммунная эффекторная функция или иммунный эффекторный ответ", как этот термин используется в данном документе, относится к функции или ответу, например, иммунной эффекторной клетки, которые усиливают иммунную атаку на целевую клетку или способствуют ей. Например, иммунные эффекторные функция или ответ относятся к свойству Т- или NK-клетки, которое способствует уничтожению или ингибированию роста или пролиферации целевой клетки. В случае с Т-клетками первичная стимуляция и костимуляция являются примерами иммунной эффекторной функции или ответа.

Используемый в данном документе термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который способствует иммунной эффекторной функции CAR-содержащей клетки, например, CAR-Т-клетки или NK-клетки, экспрессирующей CAR. Примеры иммунной эффекторной функции, например, в CAR-Т-клетке или NK-клетке, экспрессирующей CAR, включают цитолитическую активность и хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов.

В варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Иллюстративные первичные внутриклеточные сигнальные домены включают домены, полученные из молекул,

отвечающих за первичную стимуляцию или антигензависимую стимуляцию. В варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. Иллюстративные костимулирующие внутриклеточные сигнальные домены включают домены, полученные из молекул, отвечающих за передачу костимулирующих сигналов или антигеннезависимую стимуляцию. Например, в случае CART первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, и костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность корецептора или костимулирующей молекулы.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей, содержащих ITAM, включают без ограничения последовательности, полученные из CD3-дзета, общей гамма-цепи FcR (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12.

Термин "дзета" или в качестве альтернативы "дзета-цепь", "CD3-дзета" или "TCR-дзета" определяется как белок, представленный под № доступа в GenBank BAG36664.1, или эквивалентные остатки от биологического вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., и "стимулирующий домен дзета" или в качестве альтернативы "стимулирующий домен CD3-дзета" или "стимулирующий домен TCR-дзета" определяется как аминокислотные остатки цитоплазматического домена дзета-цепи или ее функционального производного, которые являются достаточными для функциональной передачи исходного сигнала, необходимого для активации Т-клеток. В одном аспекте цитоплазматический домен дзета содержит остатки 52-164 из последовательности под № доступа GenBank BAG36664.1 или эквивалентные остатки от биологического вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., которые являются его функциональными ортологами. В одном аспекте "стимулирующий домен дзета" или "стимулирующий домен CD3-дзета" представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 96.

Термин "костимулирующая молекула" относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, за счет чего опосредуется костимулирующий ответ Т-клетки, такой как без ограничения пролиферация. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые участвуют в эффективном иммунном ответе. Костимулирующие молекулы включают без ограничения молекулу MHC I класса, белки рецептора TNF, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, лиганд Toll-подобного рецептора, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-

1(CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS 5 (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается с CD83.

Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточную часть костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена следующими семействами белков: белки семейства TNF-рецепторов, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CSD, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т. п.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он получен, или его функциональный фрагмент или производное.

Термин "4-1BB" относится к представителю суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, представленной под № доступа в GenBank AAA62478.2, или эквивалентным остаткам от биологического вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.; и "костимулирующий домен 4-1BB" определяют как аминокислотные остатки 214-255 под № доступа в GenBank AAA62478.2 или эквивалентные остатки от биологического вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п. В одном аспекте "костимулирующий домен 4-1BB" представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 70, или эквивалентные остатки от биологического вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.

Термин "кодирование" относится к внутренне присущему свойству специфических последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза в ходе биологических процессов других полимеров и макромолекул, имеющих либо определенную последовательность нуклеотидов (т. е. рРНК, тРНК и мРНК), либо определенную последовательность аминокислот и биологические свойства, обусловленные ею. Таким образом, ген, кДНК

или РНК кодирует белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, продуцируется белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая нить, последовательность нуклеиновой кислоты которой идентична последовательности мРНК и обычно представлена в перечнях последовательностей, так и не кодирующая нить, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут называться кодирующими белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Если не указано иное, то "последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все последовательности нуклеиновой кислоты, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза "последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок или РНК", может также включать интроны в той степени, в которой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, может в каком-либо варианте содержать интрон(-ы).

Термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, описанных в данном документе, эффективным для достижения конкретного биологического результата.

Термин "эндогенный" относится к любому материалу, полученному из организма, клетки, ткани или системы или продуцируемому внутри них.

Термин "экзогенный" относится к любому материалу, введенному в организм, клетку, ткань или систему или продуцируемому вне их.

Термин "экспрессия" относится к транскрипции и/или трансляции конкретной последовательности нуклеиновой кислоты под управлением промотора.

Термин "вектор для переноса" относится к композиции, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которая может применяться для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области техники известны многочисленные векторы, в том числе без ограничения линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, ассоциированные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор для переноса" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Данный термин также следует толковать так, что он дополнительно включает неплазмидные и невирусные соединения, которые содействуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновое соединение, липосома и т. п. Примеры вирусных векторов для переноса включают без ограничения аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, который содержит рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности, контроля экспрессии, функционально связанные с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточное количество цис-действующих

элементов для экспрессии; при этом другие элементы для экспрессии может обеспечивать клетка-хозяин, или они обеспечиваются в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все векторы, известные в данной области техники, в том числе космиды, плазмиды (например, "голые" или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), в состав которых включен рекомбинантный полинуклеотид.

Термин "лентивирус" относится к роду из семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому они являются одним из наиболее эффективных способов доставки генов в качестве векторов. Все из HIV, SIV и FIV являются примерами лентивирусов.

Термин "лентивирусный вектор" относится к вектору, полученному из по меньшей мере части генома лентивируса, в том числе, в частности, к самоинактивирующемуся лентивирусному вектору, представленному в Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинической практике, включают без ограничения, например, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также являются доступными и будут известны специалисту в данной области техники.

Термин "гомологичный" или "идентичность" относится к идентичности последовательностей субъединиц между двумя полимерными молекулами, например, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, такими как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или между двумя полипептидными молекулами. Если положение субъединицы в обеих из двух молекул занимает одна и та же мономерная субъединица, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то они являются гомологичными или идентичными по этому положению. Гомология между двумя последовательностями находится в прямой зависимости от числа совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях является гомологичной, то эти две последовательности являются гомологичными на 50%; если 90% положений (например, 9 из 10) являются совпадающими или гомологичными, то две последовательности являются гомологичными на 90%.

"Гуманизированные" формы антител, отличных от человеческих (например, мышинных), представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как F<sub>v</sub>, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, отличного от человеческого. В большинстве случаев гуманизированные антитела и фрагменты этих антител представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело или фрагмент антитела), в которых

остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR отличного от человека вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, обладающими требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками, отличными от человеческих. Кроме того, гуманизованное антитело/фрагмент антитела может содержать остатки, не обнаруживаемые ни в реципиентном антителе, ни в заимствованных последовательностях CDR или каркасных областей. С помощью этих модификаций можно дополнительно улучшить и оптимизировать функциональные характеристики антитела или фрагмента антитела. Как правило, гуманизованное антитело или фрагмент этого антитела будут содержать практически все из по меньшей мере одного, и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все CDR-области соответствуют областям иммуноглобулина, отличного от человеческого, а все FR-области или их значительная часть представляют собой области с последовательностью иммуноглобулина человека. Гуманизованное антитело или фрагмент антитела также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Дополнительные подробности см. в Jones et al., *Nature*, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596, 1992.

"Полностью человеческий" относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, где целая молекула имеет человеческое происхождение или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной человеческой форме антитела или иммуноглобулина.

"Мышиный" относится к мышам или крысам. Например, мышиное антитело или его фрагмент содержат последовательность антитела или его фрагмента, которая выделена из животного, относящегося к мышиным, например, мыши или крысы.

Термин "выделенный" означает измененный относительно природного состояния или извлеченный из него. Например, нуклеиновая кислота или пептид, в природных условиях присутствующие в живом животном, не являются "выделенными", однако те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сопутствующих материалов в своем природном состоянии, являются "выделенными". Выделенные нуклеиновая кислота или белок могут находиться в значительной степени очищенной форме или могут находиться в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

В контексте настоящего изобретения используются следующие сокращения для общераспространенных оснований нуклеиновых кислот. "А" относится к аденозину, "С" относится к цитозину, "G" относится к гуанозину, "Т" относится к тимидину и "U" относится к уридину.

Термин "функционально связанный" или "контроль транскрипции" относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, приводящей к экспрессии последней.

Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты в тех случаях, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты размещена в функциональной взаимосвязи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две кодирующие белок области, находятся в одной и той же рамке считывания.

Термин "парентеральное введение" иммуногенной композиции включает, например, методики подкожной (s.c.), внутривенной (i.v.), внутримышечной (i.m.) или внутригрудной инъекции, внутриопухолевого введения или инфузии.

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одонитевой или двухнитевой форме. Если специально не ограничено, то данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, сходными со свойствами эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются в ходе процесса, сходного с таковым у встречающихся в природе нуклеотидов. Если не указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также в неявной форме охватывает ее варианты с консервативными модификациями (например, с заменами вырожденными кодонами), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также указанную в явной форме последовательность. В частности, замены вырожденными кодонами можно осуществлять посредством создания последовательностей, в которых в третьем положении одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов произведена замена любым из канонических оснований и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не установлено ограничение на максимальное число аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислоты, соединенные друг с другом пептидными связями. Используемый в данном документе термин относится как к коротким цепям, которые также в целом обозначаются в данной области техники, например, как пептиды, олигопептиды и олигомеры, так и к более длинным цепям, которые обычно обозначаются в данной области техники как белки, которых существует множество типов. "Полипептиды" включают, например, среди прочих, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды,

олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки. Полипептид включает природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

Термин "промотор" относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки или введенным синтетическим аппаратом, которая необходима для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Термин "промотор/регуляторная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая необходима для экспрессии генного продукта, функционально связанного с промотором/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может являться коровой промоторной последовательностью, а в других случаях эта последовательность может также содержать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии генного продукта. Промотор/регуляторная последовательность может, например, представлять собой последовательность, которая обеспечивает экспрессию генного продукта тканеспецифическим образом.

Термин "конститутивный промотор" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая, находясь в функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет генный продукт, вызывает продуцирование генного продукта в клетке в большинстве или во всех физиологических условиях клетки.

Термин "индуцируемый промотор" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая, находясь в функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет генный продукт, вызывает продуцирование генного продукта в клетке практически только в случае присутствия в клетке индуктора, который соответствует промотору.

Термин "тканеспецифический промотор" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая, находясь в функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет генный продукт, вызывает продуцирование генного продукта в клетке практически только в том случае, если клетка является клеткой того типа ткани, который соответствует промотору.

Термин "гибкий полипептидный линкер" или "линкер", используемый применительно к scFv, относится к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как глициновые и/или сериновые остатки, используемые в отдельности или в комбинации, для связывания варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи друг с другом. В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser) (SEQ ID NO: 89), повторяющуюся  $n$  раз, где  $n$  представляет собой положительное целое число, равное или превышающее 1. Например,  $n=1$ ,  $n=2$ ,  $n=3$ ,  $n=4$ ,  $n=5$  и  $n=6$ ,  $n=7$ ,  $n=8$ ,  $n=9$  и  $n=10$ . В одном варианте осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID



NO: 82). В другом варианте осуществления линкеры содержат множественные повторы (Gly2Ser) и (GlySer). В другом варианте осуществления полипептид не включает линкер, например (n=0). Также в объем настоящего изобретения включены линкеры, описанные в WO2012/138475, включенной в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе 5'-кэп (также называемый РНК-кэпом, 7-метилгуанозиновым РНК-кэпом или РНК-кэпом m<sup>7</sup>G) представляет собой модифицированный гуаниновый нуклеотид, который был добавлен к "переднему", или 5'-концу, эукариотической матричной РНК вскоре после начала транскрипции. 5'-кэп состоит из концевой группы, которая связана с первым транскрибированным нуклеотидом. Его присутствие является критически важным для распознавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэпа сопряжено с транскрипцией и происходит совместно с транскрипцией, так что каждое из этих событий влияет на другое. Вскоре после начала транскрипции 5'-конец синтезируемой мРНК связывается кэп-синтезирующим комплексом, ассоциированным с РНК-полимеразой. Этот ферментативный комплекс катализирует химические реакции, которые необходимы для кэпирования мРНК. Синтез протекает в виде многостадийной биохимической реакции. Кэпирующий фрагмент можно быть модифицирован для модулирования функциональных свойств мРНК, таких как ее стабильность или эффективность трансляции.

Используемое в данном документе "РНК, транскрибированная *in vitro*" относится к РНК, предпочтительно мРНК, которая была синтезирована *in vitro*. Как правило, РНК, транскрибированная *in vitro*, образуется из вектора транскрипции *in vitro*. Вектор транскрипции *in vitro* содержит матрицу, используемую для образования РНК, транскрибированной *in vitro*.

Используемый в данном документе "поли(А)" представляет собой группу последовательных аденозиновых остатков, присоединенных к мРНК путем полиаденилирования. В предпочтительном варианте осуществления конструкции для временной экспрессии поли(А) составляет от 50 до 5000, предпочтительно более 64, более предпочтительно более 100, наиболее предпочтительно более 300 или 400. Последовательности поли(А) могут быть модифицированы химическим или ферментативным путем для модулирования функциональных свойств мРНК, таких как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

Используемое в данном документе "полиаденилирование" относится к ковалентному связыванию полиаденильного фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. В эукариотических организмах большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-концевой поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность из адениновых нуклеотидов (зачастую несколько сотен), добавляемых к пре-мРНК под действием фермента полиаденилатполимеразы. У высших эукариот поли(А)-хвост добавляется к транскриптам, которые содержат определенную последовательность - сигнал полиаденилирования. Поли(А)-хвост и связанный с ним белок содействуют защите мРНК

от разрушения экзонуклеазами. Полиаденилирование также важно для терминации транскрипции, экспорта мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре сразу после транскрипции ДНК в РНК, но дополнительно может также происходить позднее в цитоплазме. После завершения транскрипции цепь мРНК расщепляется под действием эндонуклеазного комплекса, ассоциированного с РНК-полимеразой. Сайт расщепления обычно характеризуется наличием последовательности оснований AAUAAA вблизи сайта расщепления. После расщепления мРНК к свободному 3'-концу в сайте расщепления добавляются аденозиновые остатки.

Используемый в данном документе "временный" относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение периода нескольких часов, дней или недель, при этом период времени экспрессии меньше, чем период времени для экспрессии гена в случае, если он интегрирован в геном или содержится в пределах стабильного плазмидного репликона в клетке-хозяине.

Используемые в данном документе термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к снижению или уменьшению интенсивности прогрессирования, тяжести и/или продолжительности пролиферативного нарушения или ослаблению одного или нескольких симптомов (предпочтительно одного или нескольких различных симптомов) пролиферативного нарушения в результате введения одного или нескольких средств терапии (например, одного или нескольких терапевтических средств, таких как CAR по настоящему изобретению). В конкретных вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к уменьшению интенсивности по меньшей мере одного измеряемого физического параметра пролиферативного нарушения, такого как рост опухоли, необязательно различного для пациента. В некоторых вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к ингибированию прогрессирования пролиферативного нарушения либо с физической точки зрения, например, посредством стабилизации различного симптома, с физиологической точки зрения, например посредством стабилизации физического параметра, либо с обеих. В некоторых вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к снижению или стабилизации размера опухоли или количества раковых клеток.

Термин "путь передачи сигнала" относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами-переносчиками сигналов, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза "рецептор клеточной поверхности" включает молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать сигнал через мембрану клетки.

Предполагается, что термин "субъект" включает живые организмы, у которых можно вызвать иммунный ответ (например, млекопитающих, человека).

Термин "по существу очищенная" клетка относится к клетке, которая практически не включает других типов клеток. "По существу очищенная клетка" также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно

ассоциирована в своем встречающемся в природе состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к однородной популяции клеток. В других случаях данный термин просто относится к клетке, которая была отделена от клеток, с которыми она в природных условиях ассоциирована в своем природном состоянии. В некоторых аспектах клетки культивируют *in vitro*. В других аспектах клетки не культивируют *in vitro*.

Используемый в данном документе термин "терапевтический" означает лечение. Терапевтический эффект получают за счет ослабления, подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

Используемый в данном документе термин "профилактика" означает предупреждение или профилактическое лечение заболевания или болезненного состояния.

В контексте настоящего изобретения "опухолевый антиген", или "антиген гиперпролиферативного нарушения", или "антиген, ассоциированный с гиперпролиферативным нарушением" относятся к антигенам, которые являются общими для конкретных гиперпролиферативных нарушений. В определенных аспектах антигены гиперпролиферативного нарушения по настоящему изобретению получены из раковых опухолей, включающих без ограничения первичную или метастатическую меланому, тимому, лимфому, саркому, рак легкого, рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, формы лейкоза, рак матки, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки и формы аденокарциномы, такие как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак поджелудочной железы и т. п.

Термины "трансфицированный", или "трансформированный", или "трансдуцированный" относятся к процессу, в ходе которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. "Трансфицированная", или "трансформированная", или "трансдуцированная" клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

Термин "специфически связывается" относится к антителу или лиганду, которые распознают своего белкового партнера по связыванию (например, стимулирующий опухолевый антиген), присутствующего в образце, и связываются с ним, но при этом эти антитело или лиганд по существу не распознают или не связывают другие молекулы в образце.

Используемый в данном документе "резистентное" относится к заболеванию, например раку, которое не отвечает на лечение. В вариантах осуществления резистентный рак может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения. В некоторых вариантах осуществления резистентный рак может стать устойчивым во время лечения. Резистентный рак также называют устойчивым раком.

Субъект "отвечает" на лечение, если параметр рака (например, гематологического рака, например, рост, пролиферация и/или выживаемость раковых клеток) у субъекта замедляется или снижается на выявляемое количество, например, на приблизительно 5%,

10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше, что определяется любым подходящим показателем, например, массой, количеством клеток или объемом. В одном примере субъект отвечает на лечение, если ожидаемая продолжительность жизни субъекта увеличивается на приблизительно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или больше по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни, если лечение не проводится. В другом примере субъект отвечает на лечение, если субъект характеризуется увеличением безрецидивной выживаемости, общей выживаемости или увеличением времени до прогрессирования. Для определения того, отвечает ли пациент на лечение, могут применяться несколько способов, в том числе, например, критерии, представленные в Руководстве NCCN по клинической практике в онкологии (NCCN Guidelines®). Например, применительно к В-ALL полный ответ или пациент с полным ответом может предусматривать одно или несколько из следующего: <5% бластных клеток в ВМ, >1000 нейтрофилов/ANC (/мкл), >100000 тромбоцитов (/мкл) без циркулирующих бластных клеток или экстрамедуллярного заболевания (без лимфаденопатии, спленомегалии, инфильтрации кожи/десен/тестикулярной массы/вовлечения ЦНС), трехлинейный гематопоз и отсутствие рецидивов в течение 4 недель. Пациент с частичным ответом может предусматривать одно или несколько из >50% снижения количества бластных клеток в ВМ, >1000 нейтрофилов/ANC (/мкл), >100000 тромбоцитов (/мкл). Пациент, не отвечающий на лечение, может демонстрировать прогрессирование заболевания, например, >25% бластных клеток в ВМ. В варианте осуществления пациента с полным ответом определяют как имеющего 7% или больше CD27+ CD45RO- клеток в популяции CD8+. В варианте осуществления процент CAR+ клеток на уровнях до сбора отличает пациентов с ответом (например, пациентов с полным ответом и пациентов с частичным ответом) от пациентов без ответа (NR).

Используемый в данном документе термин "рецидив" относится к повторному появлению рака после начального периода восприимчивости (например, полного ответа или частичного ответа). Начальный период восприимчивости может предусматривать падение уровня раковых клеток ниже определенного порога, например, ниже 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. Повторное появление может предусматривать возрастание уровня раковых клеток выше определенного порога, например, выше 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. Например, применительно к В-ALL повторное появление может предусматривать, например, повторное появление бластов в крови, костном мозге (> 5%) или любом экстрамедуллярном участке после достижения полного ответа. Полный ответ в данном контексте может предусматривать < 5% бластных клеток в ВМ. В более широком смысле в варианте осуществления ответ (например, полный ответ или частичный ответ) может предусматривать отсутствие выявляемого MRD (минимального остаточного заболевания). В варианте осуществления начальный период восприимчивости длится по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней; по меньшей мере 1, 2, 3 или 4 недели; по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 или 12 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет.

"Регулируемый химерный антигенный рецептор (RCAR)", как этот термин

используется в данном документе, относится к набору полипептидов, как правило, в простейших вариантах осуществления двух, которые, находясь в клетке RCARX, наделяют клетку RCARX специфичностью в отношении целевой клетки, как правило, раковой клетки, и регулируемой генерацией внутриклеточного сигнала или пролиферацией, что может оптимизировать иммуноэффекторное свойство клетки RCARX. Клетка RCARX, по меньшей мере частично, зависит от антигенсвязывающего домена в обеспечении специфичности в отношении целевой клетки, которая содержит антиген, связываемый антигенсвязывающим доменом. В варианте осуществления RCARX содержит димеризационный переключатель, который при наличии димеризующей молекулы может сопрягать внутриклеточный сигнальный домен с антигенсвязывающим доменом.

"Мембранный якорь" или "домен прикрепления к мембране", как этот термин используется в данном документе, относится к полипептиду или фрагменту, например, к миристоильной группе, достаточному для заякоривания внеклеточного или внутриклеточного домена в плазматической мембране.

"Переключающий домен", как этот термин используется в данном документе, например, в отношении RCAR, относится к объекту, как правило, объекту на основе полипептида, который в присутствии димеризующей молекулы ассоциирует с другим переключающим доменом. Ассоциация приводит к функциональному сочетанию первого объекта, связанного, например слитого, с первым переключающим доменом, и второго объекта, связанного, например слитого, со вторым переключающим доменом. Первый и второй переключающие домены в совокупности называются димеризационным переключателем. В вариантах осуществления первый и второй переключающие домены являются одинаковыми, например, они являются полипептидами, имеющими одинаковую первичную аминокислотную последовательность, и в совокупности называются гомодимеризационным переключателем. В вариантах осуществления первый и второй переключающие домены отличаются друг от друга, например, они являются полипептидами, имеющими разные первичные аминокислотные последовательности, и в совокупности называются гетеродимеризационным переключателем. В вариантах осуществления переключатель является внутриклеточным. В вариантах осуществления переключатель является внеклеточным. В вариантах осуществления переключающий домен представляет собой объект на основе полипептида, например, объект на основе FKBP или FRB, а димеризующая молекула представляет собой низкомолекулярное соединение, например рапалог. В вариантах осуществления переключающий домен представляет собой объект на основе полипептида, например, scFv, который связывает пептид тус, а димеризующая молекула представляет собой полипептид, его фрагмент или мультимер полипептида, например, лиганд тус или мультимеры лиганда тус, которые связываются с одним или несколькими scFv к тус. В вариантах осуществления переключающий домен представляет собой объект на основе полипептида, например, тус-рецептор, а димеризующая молекула представляет собой антитело или его

фрагменты, например, антитело к тус.

"Димеризующая молекула", как этот термин используется в данном документе, например, в отношении RCAR, относится к молекуле, которая способствует ассоциации первого переключающего домена со вторым переключающим доменом. В вариантах осуществления димеризующая молекула в природных условиях не встречается у субъекта или не встречается в концентрациях, которые приводили бы к значительной димеризации. В вариантах осуществления димеризующая молекула представляет собой низкомолекулярное соединение, например, рапамицин или рапалог, например, RAD001.

Термин "биоэквивалент" относится к количеству средства, отличного от эталонного соединения (например, RAD001), необходимого для получения эффекта, эквивалентного эффекту, вызываемому эталонной дозой или эталонным количеством эталонного соединения (например, RAD001). В варианте осуществления эффект представляет собой уровень ингибирования mTOR, например, измеряемый по ингибированию киназы P70-S6, например, оцениваемому в анализе *in vivo* или *in vitro*, например, измеряемому с помощью анализа, описанного в данном документе, например анализа по Boulay, или измеряемый по уровням фосфорилированного S6 с помощью вестерн-блоттинга. В варианте осуществления эффект представляет собой изменение соотношения PD-1-положительные/PD-1-отрицательные Т-клетки, измеряемого с помощью сортировки клеток. В варианте осуществления биоэквивалентное количество или доза ингибитора mTOR представляют собой количество или дозу, которые достигают того же уровня ингибирования киназы P70-S6, что и эталонная доза или эталонное количество эталонного соединения. В варианте осуществления биоэквивалентное количество или доза ингибитора mTOR представляют собой количество или дозу, которые достигают того же уровня изменения соотношения PD-1-положительные/PD-1-отрицательные Т-клетки, что и эталонная доза или эталонное количество эталонного соединения.

Термин "низкая доза, усиливающая иммунный ответ" при использовании в отношении ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора mTOR, например, RAD001 или рапамицина, или каталитического ингибитора mTOR, относится к дозе ингибитора mTOR, которая частично, но не полностью, ингибирует активность mTOR, например, измеряемую по ингибированию активности киназы P70-S6. Способы оценки активности mTOR, например, по ингибированию киназы P70-S6, обсуждаются в данном документе. Доза является недостаточной, чтобы вызвать полное подавление иммунитета, но достаточной для усиления иммунного ответа. В варианте осуществления низкая доза, усиливающая иммунный ответ, ингибитора mTOR приводит к уменьшению числа PD-1-положительных Т-клеток и/или увеличению числа PD-1-отрицательных Т-клеток или увеличению соотношения PD-1-отрицательные Т-клетки/PD-1-положительные Т-клетки. В варианте осуществления низкая доза, усиливающая иммунный ответ, ингибитора mTOR приводит к увеличению числа "наивных" Т-клеток. В варианте осуществления низкая доза, усиливающая иммунный ответ, ингибитора mTOR приводит к одному или

нескольким из следующего:

увеличению экспрессии одного или нескольких из следующих маркеров: CD62L<sup>высокий</sup>, CD127<sup>высокий</sup>, CD27<sup>+</sup> и BCL2, например, на Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти;

уменьшению экспрессии KLRG1, например, на Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти; и

увеличению числа предшественников Т-клеток памяти, например, клеток с любой из следующих характеристик или их комбинацией: увеличенным уровнем CD62L<sup>высокий</sup>, увеличенным уровнем CD127<sup>высокий</sup>, увеличенным уровнем CD27<sup>+</sup>, уменьшенным уровнем KLRG1 и увеличенным уровнем BCL2;

где любое из изменений, описанных выше, происходит, например, по меньшей мере временно, например, по сравнению с субъектом, не получающим лечение.

Диапазоны: во всем настоящем раскрытии различные аспекты настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазонов служит лишь для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретно раскрывающее все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание такого диапазона, как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрывающее 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 пределах такого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера, диапазон, такой как 95-99% идентичность, включает что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью и включает поддиапазоны, такие как 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% и 98-99% идентичность. Это применимо независимо от ширины диапазона.

#### Двойные CAR

В настоящем изобретении раскрыты, по меньшей мере частично, новые молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы химерного антигенного рецептора (CAR), содержащие первый CAR, предусматривающий CAR для CD22, и второй CAR, предусматривающий CAR для CD19, например, двойные CAR, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD22 содержит антигенсвязывающий домен для CD22 и первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит антигенсвязывающий домен для CD19 и второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и/или второй первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления молекулы CAR, раскрытой в данном документе, молекула CAR содержит две идентичные полипептидные последовательности, например, первого и второго трансмембранного домена; первого и второго костимулирующего домена и/или первого и второго первичного сигнального домена, полипептидные последовательности которых

кодируются разными нуклеотидными последовательностями. Также в данном документе раскрыты способы применения указанных молекул CAR.

Не ограничиваясь теорией, полагают, что в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу CAR, например, молекулу двойного CAR, является оптимизированной, например, кодон-оптимизированной, для предупреждения рекомбинации, например, гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления молекула CAR, например, молекула двойного CAR, содержит два домена, например, первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен, каждый из которых содержит сходную аминокислотную последовательность, но кодируется отличающейся нуклеотидной последовательностью.

В одном аспекте молекула CAR, раскрытая в данном документе, содержит первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен, первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен.

В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) из CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A или 3A; и/или одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) из CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A или 3A. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC из CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблице 1A, 2A или 3A; и/или CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC из CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A, 2A или 3A.

В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 LC под SEQ ID NO: 28, CDR2 LC под SEQ ID NO: 29 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 30. В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 LC под SEQ ID NO: 31, CDR2 LC под SEQ ID NO: 32 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 33. В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 LC под SEQ ID NO: 34, CDR2 LC под SEQ ID NO: 32 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 30.

В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 HC под SEQ ID NO: 20, CDR2 HC под SEQ ID NO: 21 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 22. В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 HC под SEQ ID NO: 23, CDR2 HC под SEQ ID NO: 24 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 22. В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 HC под SEQ ID NO: 25, CDR2 HC под SEQ ID NO: 26 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 27.



В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 LC под SEQ ID NO: 28, CDR2 LC под SEQ ID NO: 29 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 30 и CDR1 HC под SEQ ID NO: 20, CDR2 HC под SEQ ID NO: 21 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 22.

В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 LC под SEQ ID NO: 31, CDR2 LC под SEQ ID NO: 32 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 33 и CDR1 HC под SEQ ID NO: 23, CDR2 HC под SEQ ID NO: 24 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 22.

В варианте осуществления CD22-связывающий домен содержит CDR1 LC под SEQ ID NO: 34, CDR2 LC под SEQ ID NO: 32 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 30 и CDR1 HC под SEQ ID NO: 25, CDR2 HC под SEQ ID NO: 26 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 27.

В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 (например, scFv) содержит переменную область легкой цепи (VL) CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A или 3A; и/или переменную область тяжелой цепи (VH) CD22-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1A или 3A. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности области VL для CD22, представленной в таблице 1A или 3A. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью VL для CD22, представленной в таблице 1A или 3A. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность области VL для CD22, представленную в таблице 1A или 3A. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности области VH для CD22, представленной в таблице 1A или 3A. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью VH для CD22, представленной в таблице 1A или 3A. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность области VH для CD22, представленную в таблице 1A или 3A.

В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности scFv для CD22, представленной в таблице 1A или 3A, например, SEQ ID NO: 50. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность с по меньшей

мере 95% идентичностью с последовательностью scFv для CD22, представленной в таблице 1А или 3А, например, SEQ ID NO: 50. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD22, представленную в таблице 1А или 3А, например, SEQ ID NO: 50. В варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, который кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью scFv для CD22, представленной в таблице 1А или 3А, например, SEQ ID NO: 49 или 51.

В одном аспекте молекула CAR, раскрытая в данном документе, содержит второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) из CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1А, 2А, 3А или 5А; и/или одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) из CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1А, 2А, 3А или 5А. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC из CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблице 1А или 2А; и/или CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC из CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблице 1А, 2А или 3А. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит CDR1 LC под SEQ ID NO: 40, CDR2 LC под SEQ ID NO: 41 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 42 и/или CDR1 HC под SEQ ID NO: 35, CDR2 HC под SEQ ID NO: 36-38 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 (например, scFv) содержит переменную область легкой цепи (VL) CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1А, 3А или 5А; и/или переменную область тяжелой цепи (VH) CD19-связывающего домена, описанного в данном документе, например, в таблицах 1А, 3А или 5А. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности области VL для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А

или 5А. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью VL для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность области VL для CD19, представленную в таблицах 1А, 3А или 5А. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности области VH для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью VH для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность области VH для CD19, представленную в таблицах 1А, 3А или 5А.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в последовательности scFv для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А, например, SEQ ID NO: 44. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью scFv для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А, например, SEQ ID NO: 44. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD19, представленную в таблицах 1А, 3А или 5А, например, SEQ ID NO: 44. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, который кодируется нуклеотидной последовательностью, характеризующейся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с последовательностью scFv для CD19, представленной в таблицах 1А, 3А или 5А, например, SEQ ID NO: 43 или 48.

В одном аспекте молекула CAR, раскрытая в данном документе, содержит первый CAR, содержащий первый трансмембранный домен, и второй CAR, содержащий второй трансмембранный домен. В варианте осуществления первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат одинаковую аминокислотную последовательность, например, раскрытую в данном документе. В варианте осуществления первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен

кодируются первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью соответственно. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность отличаются по меньшей мере одним нуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен представляют собой одинаковый трансмембранный домен, например, выбранный из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137 или CD154.

В некоторых вариантах осуществления первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен представляют собой разные трансмембранные домены, например, выбранные из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD123, CD134, CD137 и CD154.

В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу CAR, описанную в данном документе, содержит первый CAR, содержащий первый трансмембранный домен, и второй CAR, содержащий второй трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат трансмембранный домен CD8-альфа. В некоторых вариантах осуществления первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

В одном аспекте молекула CAR, раскрытая в данном документе, содержит первый CAR, содержащий первый костимулирующий домен, и второй CAR, содержащий второй костимулирующий домен. В варианте осуществления первый костимулирующий домен и второй костимулирующий домен содержат одинаковую аминокислотную последовательность, например, раскрытую в данном документе. В варианте осуществления первый костимулирующий домен и второй костимулирующий домен кодируются первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью соответственно. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность отличаются по меньшей мере одним нуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления первый костимулирующий домен и второй костимулирующий домен представляют собой одинаковый костимулирующий домен, например, выбранный из сигнального домена OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) или 4-1BB (CD137).

В некоторых вариантах осуществления первый костимулирующий домен и второй костимулирующий домен представляют собой разные костимулирующие домены, например, выбранные из сигнального домена OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) или 4-1BB (CD137).

В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу CAR, описанную в данном документе, содержит первый CAR, содержащий первый костимулирующий домен, и второй CAR, содержащий второй костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления первый костимулирующий домен и второй костимулирующий домен содержат костимулирующий домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления первый костимулирующий домен и второй костимулирующий домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу CAR, например, содержащую (i) первый CAR, содержащий антигенсвязывающий домен для CD22, и (ii) второй CAR, содержащий антигенсвязывающий домен для CD19. В вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит РНК или ДНК. В вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие (i) и (ii), располагаются в одинаковой ориентации, например, транскрипция последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих (i) и (ii), осуществляется в одном и том же направлении. В вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие (i) и (ii), располагаются в разных ориентациях. В вариантах осуществления один промотор регулирует экспрессию последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих (i) и (ii). В вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая сайт расщепления протеазой (такой как сайт расщепления T2A, P2A, E2A или F2A), располагается между последовательностями нуклеиновой кислоты, кодируемыми (i) и (ii). В вариантах осуществления сайт расщепления протеазой размещен таким образом, что клетка может экспрессировать слитый белок, содержащий (i) и (ii), при этом белок впоследствии подвергается процессингу посредством протеолитического расщепления с получением двух пептидов. В некоторых вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие (i), находятся выше последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих (ii), или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие (ii), находятся выше последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих (i). В вариантах осуществления первый промотор контролирует экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей (i), и второй промотор контролирует экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей (ii). В вариантах осуществления

нуклеиновая кислота представляет собой плазмиду. В вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит элемент вирусной упаковки. В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрена клетка, например, иммунная эффекторная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, например, нуклеиновую кислоту, содержащую (i) и (ii), описанные выше. Клетка может содержать протеазу (например, эндогенную или экзогенную), которая расщепляет сайт расщепления T2A, P2A, E2A или F2A.

Иллюстративные нуклеотидные и аминокислотные последовательности молекулы CAR, например, молекулы двойного CAR, раскрытой в данном документе, представлены в таблице 1А.

Таблица 1А. Последовательности двойного и тандемного CAR для CD19-CD22

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
<i>Тандемные CAR для CD19-CD22</i>		
CG#c171	1	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggc ccgaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagccttcaccgggtgagcgcgcaa ccctgtcttcagagcctccaagacatctcaaaataccttaattggatcaacagaagcc cggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgcc aggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagcca gaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacaccttggacagg gcaccaagctcagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtg gaggaagccagggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaac tcttctactgactgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgcttggatcag acagccaccggggaagggtctggaatggattggagtatttggggctctgagactactta ctaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaggacaactetaagaatcaggtg tactgaaactgtcatctgtgaccgagccgacaccgccgtgactattgcgctaagcatt actattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagcttggcagaagccgccgcgaaagaagtgcagctcaacaatcaggaccaggact cgtcaaacatcacagaccctctccctcacatgtgcatctccggggactccatggtgagc aattccgacacttggaaattggattagacaaagcccgtcccgggtctggaatggtggga cgcacctaccaccgggtctacttggtagcagactacgcgtcatccgtcgggggaagagt gtccatcaacgtggacacctcaagaaccagtagcagcctcagcttaatgccgtgactcc tgaggatacggcgtctactactgcgcccgcgtccgcctgaagacgggaacagctgg agc gatgcattc galgtctggggccagggaactatggtcaccgtgtcgtctgggggcggt ggatcgggtggcgggggtcggggggcggcggctctcagtcctcttaccacaaccgg cctcagcctcggggagccccggccagagcgtgaccatttctgcaccggcacttcatcc

	<p>gacgtgggcggtacaactacgtgtcctggtaccaacagcaccgggaaaggcccca  agctcatgatctacgacgtgtccaacagccctcgggagtggtccaaccggttctcgggtt  cgaaatcgggaaacacagccagcctgaccatcagcggactgcaggctgaagatgaag  ccgactactactgtcctctacacctcgtcatccacgtctacgttctcgactggaact  cagctgactgtgctgaccactacccagcaccgagccaccaccccggtcctaccat  cgcctcccagcctctgtcctcgcgtccggagcatgtagaccgcagctggtggggccg  tgcatacccggggtcttgacttcgctcgcgatctacatttgggccctctggctggtactt  gcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagct  gctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacgg  ctgttcatgccgggtcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattca  gccgcagcgcagatgctccagcctaccagcagggcagaaccagctctacaacgaact  caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacc  agaaatgggcggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagct  ccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcaga  agaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacac  ctatgacgctcttccatgcaggccctgcccctcgg</p>
2	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGER  ATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSG  IPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYT  FGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK  PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIW  GSETYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA  VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSLAEAAK  EVQLQQSGPGLVKPSQTLTLCAISGDSMLSNSDTWNWI  RQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSIIVDT  SKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAF  DVWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPAS  ASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK  LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA  DYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIA  SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT  CGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE  DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY  NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL  YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLST</p>

		ATKDTYDALHMQALPPR
CG#c182	3	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccctcggc  ccgaagtgcagctcaacaatcaggaccaggactcgtcaaacatcacagaccctctcc  ctcacatgtgccatctccgggactccatgttgagcaattccgacacttgaattggattag  aaaagcccgtcccgggtctggaatggtgggacgcacctaccaccggtctacttgta  cgacgactacgcgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaacgtggacacctccaaga  accagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcctgaggatcgggctctactactgcg  cccgcgtccgctgcaagacgggaacagctggagcgtgacatcgtctctggggcca  gggaactatggtcacctgtctctggggcggtggatcgggtggcgggggttcgggg  ggcggcggctctcagtccgctcttaccacccggcctcagcctcggggagccccggcc  agagcgtgaccatttctgcaccggcacttcatccgacgtggcggtacaactacgtgt  cctggtaccaacagcaccgggaaaggccccaagctcatgatctacgacgtgtccaac  aggccctcgggagtgtccaaccggtctcgggtcgaatcgggaaacacagccagcct  gaccatcagcggactgcaggctgaagatgaagccgactactactgctcctctacacctc  gtcatccacgctctactgttccgactggaactcagctgactgtgctgggagggggag  ggagtgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagccttaccgggtgagcgcg  caaccctgtctgcagagcctccaagacatctaaaataccttaattggtatcaacagaa  gcccggacaggtcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccct  gccaggtcagcggtagcggatctgggaccgactacacctactatcagctcactgca  gccagaggacttcgctgtctatttctgcagcaagggaacacctgccctacaccttggga  cagggcaccaagctcagatfaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggc  ggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcag  aaactcttactgacttgtactgtgagcggagtgtctctcccgattacggggtgtcttga  tcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtatttgggctctgagact  acttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatc  aggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgactattgcgctaa  gcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtactctgtgcacc  gtgtccagcaccactacccagcaccgagggccaccaccccggtcctaccatcgcctc  ccagcctctgcctcgcgtccggagcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcata  cccgggtcttgactcgcctgcgatatctacattgggcccctctggtggtacttgcggg  gtcctgtgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgta  catcttfaagaaccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttca  tgccggttcccagaggaggaggaagcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgca  gcgcatgtctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatctt  ggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaat</p>



		<p>gggcgggaagccgcgcagaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaa  ggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagagc  aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacatgac  gctcttccatgcaggccctgccgctcgg</p>
	4	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTL  SLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRS  TWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTG  VYYCARVRLQDGNSWSDAFDVGQGMVTVSSGGGG  SGGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSD  VGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFS  GSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTG  TQLTVLGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDI  SKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSG  TDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKG  GGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS  GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLK  SRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYG  GSYAMDYWGQGTLLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLS  LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL  LLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN  LGRREEYDVLDRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNEL  QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKD  TYDALHMQUALPPR</p>
CG#c188	5	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgctcggc  cccagtcctcttaccacaaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtgac  catttctgcaccggcacttcatccgacgtggcggtacaaactacgtgtcctggtaccaa  cagcaccgggaaaggccccaagctcatgatctacgacgtgtccaacagccctcgg  gagtgtccaaccggttctcgggttcgaaatcgggaaacacagccagcctgacctcagc  ggactgcaggctgaagatgaagccgactactactgctcctctacacctgctcatccacg  ctctacgtgttcggcactggaactcagctgactgtgctggggcggaggaggctccgaagt  gcagctcaacaatcaggaccaggactcgtcaaacatcacagaccctctccctcatg  tgccatctccgggactccatgttgagcaatccgacacttggaaatggattagacaaagc  ccgtcccggggtctggaatggttgggacgcacctaccaccggctacttggctacgacga  ctacgcgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaacgtggacacctccaagaaccagt</p>

	<p>acagcctgcagcttaatgccgtgactcctgaggatacgggctctactactgcgcccgcg  tccgctgcaagacgggaacagctggagcgcgattcgatgtctggggccagggaac  tatggtcaccgtgtcgtctggagggggaggagtgaaattgtgatgaccagtcaccg  ccactcttagcctttcaccgggtgagcgcgaacctgtcttcagagcctccaagacat  ctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctgccttctgatctacc  acaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggacc  gactacacctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgcagca  agggaacacacctgcctacaccttggacagggcaccagctcgagattaaaggtggag  gtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggccaactccaagaa  agcggaccgggtcttgaagccatcagaaactcttactgacttgtactgtgagcggag  tgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaat  ggattggagtgatttggggctctgagactactactaccaatcatccctcaagtcacgcgtc  accatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcag  ccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatgga  ttactggggacaggggtactctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgagggc  caccacccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggagggcatgta  gaccgcagctgggtggggccgtgcatacccgggtcttgacttcgctgcgatatctaca  tttgggccctctggctgggtacttgcggggctctgctgcttactcgtgatcactcttactg  taagcgcggtcggagaagctgctgtacatcttaagcaaccttcatgaggcctgtgca  gactactcaagaggaggacggctgtcatgccggtcccagaggaggaggaaggcgg  ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcagggg  cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacgacgtgctgga  caagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccc  caagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgaga  ttggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaagccacgacggactgtaccagggac  tcagcaccgccaccaaggacacatgacgctcttcacatgcaggccctgcgcctcgg</p>
6	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQSV  TISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNR  PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSS  STLYVFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLS  LTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRST  WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGV  YYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVTVSSGGGGS  EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQK  PGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQP</p>

		<p>EDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSG  GGGSQVQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGV  WIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNS  KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYW  GQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA  GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK  RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC  ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  KRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP  R</p>
CG#c224	7	<p>atggccctgccgtgactgcgctcctgcttccgtggccctgctcctgcatgccgccagac  ctcagtcgctctgactcagccggcctcagcttcgggggccctggcaaacgcactat  ttcctgtaccggaacctcatcagacgtggcgggctacaattacgtgctctgtaccaacag  caccgccgaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgccaaccggccgtcaggagt  gtccaacagattctccggctccaagagcggaaactgccagcttgaccattagcggctt  gcaggccgaggacgaagccgactactactgctctagctacacatcctcgtctaccctta  cgtgtttggaacggggaccagctgactgtgctcgggggtggaggatcagaggtgcaa  ctccagcagtcggctcctggcctcgtgaaaccgtcccaaacctgtccctgacttgcc  atctcgggcgactccatgctgtccaattccgacacctggaactggattagacaatcgcta  gccggggactcgaatggctgggccggacctaccaccgtccacgtggatgacgacta  cgcaagctccgtccggggaagggtgccattaacgtcgatacctccaagaaccagtaca  gccttcagctgaacgctgtgacccccaggataccggcgtctactactgtgcaagagtgc  gattgcaggatggaaactcgtggtcggacgcattcgaatgctctggggacagggaaactatg  gtgaccgtgctcctcgggcggaggcgggagcggaggaggaggtctggcggaggagg  aagcgagattgcatgactcagtcgccggccacctctccctgtcaccggagaaagag  caacctgagctgcagggcgtcccaggacatctcgaagtacctgaactggtaccagcag  aagcctggacaagcaccgccctcctgatctaccacacctcgcggctgattcgggaat  ccccgccagattctcaggagcggatcaggaaccgactacacctgactatctcagacc  tgaaccagaggatttcgccgtgacttctgccagcaaggaaacacctgccctacacct  tggacagggaaaccaagctcgagattaaggggggtggtggatcgggaggggggtggatc  aggaggaggcggctcacaagtccagctgcaagaatccggctccgggactgtgaagccg  tccgaaacctgtcactgactgtgctcgggggtgcattgccgactacggcgtga  gctggattcggcagccccctgaaagggtggaatggatcggcgtgatctggggttcg  gaaactacctatcagtcctcactgaagtcccgcgtgacctcagcaaggataattcca</p>

		<p>aaaaccaagtgtctctgaagctctccagcgtcactgccgccgatactgccgtgtactactg  cgccaagcactactattacggcggttcgtacgccaatggactactggggccaagggacac  tcgtgaccgtgtcatccaccactaccccagcaccgaggccaccaccccgctcctacc  atcgctcccagcctctgtcctcgtcggagggcatgtagaccgcagctggtggggc  cgtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatctctacatttgggcccctctggctgga  cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaag  ctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacg  gctgttcatgccggtccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattc  agccgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaa  ctcaatcttggcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggac  ccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaaggggctgtacaacga  gctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc  agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagga  cacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
	8	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQSV  TISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNR  PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSS  STLYVFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLS  LTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRST  WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGV  YYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQGTMTVSSGGGGS  GGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIS  KYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGT  DYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGG  GGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG  VSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLKS  RVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGG  SYAMDYWGQGLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR  PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLS  LVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR  REEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKD  KMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYD  ALHMQUALPPR</p>
CG#c227	9	atggccctgcccgtagctgcgctcctgcttccggtggccctgctcctgcatgccgccagac

	<p>ctcagtccgctctgactcagccggcctcagcttcgggggtcccctgggtcaagcgtcactat ttcctgtaccggaacctcatcagacgtggggcggtacaattacgtgtcctgttaccacag caccccgaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggccgtcaggagt gtccaacagattctccggctccaagagcggaaactgccagcttgaccattagcggctt gcaggccgaggacgaagccgactactgtctctagctacacatcctcgtctaccctcta cgtgtttggaacggggaccagctgactgtgctcgggggtggaggatcagaggtgcaa ctccagcagtcgggtcctggcctcgtgaaaccgtcccaaacctgtccctgacttgcgcc atctcgggcgactccatgctgtccaattccgacactggaactggattagacaatgccta gccggggactcgaatggctgggccggacctaccaccgggtccacgtggfatgacgacta cgcaagctccgtccggggaagggtgtccattaacgtcgatactccaagaaccagtaca gccttcagctgaacgtgtgacccccgaggataccggcgctactactgtgcaagagtgc gattgcaggatggaaactcgtggtcggacgcattc gatgtctggggacagggaactatg gtcactgtgtcctccggcgggtggaggctcggggggggggcggtcaggaggaggcggc tcacaagtccagctgcaagaatccgggtccgggacttgaagccgtccgaaacctgtca ctgacttgcactgtgtccgggggtgctattgcccgactacggcggtgagctggattcggcag ccccctggaaaggattggaatggatcggcgtgatctgggggtcggaaactacctactat cagtcctcactgaagtcccgcgtgaccatcagcaaggataattccaaaaaccaagtgtct ctgaagctctccagcgtcactgccgccgatactgccgtgtactactgcgccaagcactact attacggcggftcgtacgccatggactactggggacaaggcactcttgtgactgtgcaag cggcgggtggaggagcgggtggggcggttcaggaggaggcggatcagagatcgtga tgaccaatccccagccacctgtccctcagccctggagaaagagccacctgagctgc cgggcctcccaggatcagcaagtactgaaactggtaccaacaaaagccggggcagg cgccccggctcctgatctaccacactcgcctccactcaggatccccgccagattctc agggagcggctccggtactgactacacctgactatttctcactgcagccagaggacttt gccgtgtacttctgccagcagggaacactctgccgtacacctcgggcagggaacgaa gcttgaattaagaccactaccagcaccgagccaccaccccggtcctaccatcg ctccccagcctctgtccctcgtcggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtg cataccggggcttctgacttcgctcgcgatatctacattggggcccctctggctgtacttg cggggctcctgctgttctcactcgtgatcactcttactgtaagcgggtcggaaagactg ctgtacatcttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggct gttcatgccgggtcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgctgaaattcag ccgcagcgcagatgtccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactc aatcttggtcggagagaggagtacgactgtctggacaagcggagaggacgggacca gaaatggggcgggaagccgcgagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctc caaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaa</p>
--	--

		gaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacct atgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg
	10	MALPVTALLLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQSV TISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNR PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSS STLYVFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLS LTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGV YYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQGMVTVSSGGGGS GGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLSRVT ISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSP ATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLL IYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQGNTLPYTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
<i>Двойные CAR для CD19-CD22</i>		
<b>CG#с201</b>		
Полноразмерная последовательность нуклеиновой кислоты двойного CAR для CD19-CD22	11	atggccctccctgtcaccgacctgctgctccgctggctctctgctccacgccgctcggc ccgaagtgcagctgcagcagtcagggcctggcctggcaagccgtcgcagacctctc cctgacatgcgccattagcggggactccatgctgagcaactcggacacctggaactgga ttcggcagtccccctccggggactcagtggtcggacgcacctaccatcggagcactt ggtacgacgactacgcctcctcctgagaggtcgcgtgctgatcaacgtggatacctcga agaaccagtatagcttgaactgaacgccgtgacctgaggataccggagtgtactatt gtgcgagagtcaggctgcaagacggaaactcctggccgacgcatttgatgctgggga cagggtactatggtcacggtgcatctggaggcggaggatcgaaagcgcctgactca gccggettcggctagcggttaccggggcagtcctgactatctcctgcaccgggacttc ctccgacgtgggaggctacaattacgtgtcctggtaccagcaacccccggcaagccc caaagctgatgatctacgacgtcagcaacagaccagcggagtgtccaaccggttcagc

	<p> ggctccaagtccggcaacaccgcctcctgaccatcagcgggcttcaggccgaagatg  aggcggattactactgctcctcgtacacctcaagctcaactctgtacgtgttcggcaccggt  actcagctcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccaccacccccggctcctac  catcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtgggg  ccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatctacatttgggcccctctggctggt  acttgcggggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggagaa  gctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggac  ggctgttcatgccggtcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaatt  cagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacga  actcaatcttggcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggga  cccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccagagggcctgtacaacga  gctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc  agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagga  cacctatgacgctcttcatgacggccctgccgcctcggggaagcggagctactaactt  cagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaacctggacctatggccttacca  gtgaccgccttgctcctgccgctggccttgcctccacgccgccaggccgaaattgtg  atgaccagtcaccgccactcttagccttccaccgggtgagcgcgaacctgtcttga  gagcctcccaagacatcctaaaatccttaattggtatcaacagaagccggacaggtc  ctcgccttctgatctaccacaccagccggctcattctggaatccctgccagggtcagcgg  tagcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagccagaggacttgc  tgtctattctgtcagcaagggaacacctgccctacaccttggacagggcaccaagctc  gagattaaagggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcca  ggccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttactgac  ttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccg  gggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcat  ccctcaagtcacgcgtcaccatctaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaact  gtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggc  gggagctacgcaatggattactggggacaggggtactctggtcaccgtgtccagcaccac  gacgccagcggcggaccaccaacaccggcggccaccatcgcgtcgcagcccctgtc  cctgcgccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgcagtgcacacgaggggg  ctggacttcgcctgtgatctacatctgggcgcccttggccgggacttgggggtccttct  cctgtcactggtatcacccttactgcaaacggggcagaaagaactcctgtatatattca  aacaaccattatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatt  tccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcaga  cgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacga </p>
--	--

		<p>agagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaa  agccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaaataagat  ggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcggcggagggggcaaggggc  acgatggcctttaccagggctcagtagaccaccaaggacacctacgacgcccttcaca  tgcaggccctgccccctcgc</p>
<p>Полноразмерная  аминокислотная  последовательность  двойного  CAR для CD19-  CD22</p>	12	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTL  SLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRS  TWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTG  VYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMTVSSGGGG  SQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWY  QQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI  SGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPA  PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD  IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM  RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY  QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR  RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHD  GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGGATNFSLLKQA  GDVEENPGMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPA  TSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQKPGQAPRLLI  YHTSRLHSGIPARFSGSGGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC  QQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSSQVQL  QESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK  GLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL  SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTV  SSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR  GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSR  SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP  EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER  RRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
<p>CAR для CD22  (с сайтом P2A)</p>	13	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTL  SLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRS  TWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTG  VYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMTVSSGGGG</p>



		<p>SQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGINVYVSWY          QQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI          SGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPA          PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD          IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM          RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY          QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPR          RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDH          GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGSATNFSLLKQA          GDVEENPG</p>
CAR для CD19	14	<p>PMALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGER          ATLSRASQDISKYLWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSG          IPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYT          FGQGTKLEIKGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK          PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIW          GSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA          VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTTPAPRP          PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI          WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRP          VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ          GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPRRK          NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGL          YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
<b>CG#c203</b>		
Полноразмерная последовательность нуклеиновой кислоты двойного CAR для CD19-CD22	15	<p>atggcctaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccagg          ccggaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttaccgggtgagcgcgca          accctgtcttcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagc          ccggacaggtcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgc          cagggtcagcggtagcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagcc          agaggacttcgctgtctattctgtcagcaagggaacacctgcctacacctttggacag          ggcaccaagctcagattaaagggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggg          ggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtctgtgaagccatcagaaa          ctctttcactgactgtactgtgagcggaggtgtctctccccgattacgggggtgtcttgatca          gacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgattggggctctgagactact          actaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggt</p>

	<p> gtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgactattgcgctaagcat  tactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt  ccagcaccacgacgccagcggcgcgaccaccaacaccggcggccaccatcgcgteg  cagccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgagtgca  cacgagggggctggacttcgctgtgatactacatctgggcgcccttggccgggacttg  tggggctcttctctgtcactggtatcacctttactgaaacggggcagaaagaaactcc  tgtatataattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgt  agctgccgatttcagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagtccagcag  gagcgcagacgccccgcgtaccagcaggccagaaccagctctataacgagctcaat  ctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggaccctgaga  tgggggaaagccgagaaggagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcaga  aagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcggcggagggg  gcaaggggcacgatggccttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacga  cgccctcacatgcaggccctgccccctcgcggaagcggagctactaactcagcctgct  gaagcaggctggagacgtggaggagaaccctggacctatggccctccctgtcaccgcc  ctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccgaagtgcagctgcagcag  tcagggcctggcctggtcaagcctcgcagaccctcctcctgacatgcgccattagcgg  ggactccatgctgagcaactcggacacctggaactggattcggcagctccccttccggg  gactcagatggctcggacgcacctaccatcggagcacttggtagcagactacgcctcc  tccgtgagaggtcgcgtgctgatcaactggatacctcgaagaaccagtatagcttcaa  ctgaacgccgtgaccctgaggataccggagtgtactattgtgcgagagtcaggctgca  agacggaaactcctggtccgacgcattttagtctggggacagggtactatggtcacggt  gtcatctggaggcggaggatcgaaaagcgcctgactcagccggcttcggctagcggtt  caccggggcagctccgtgactatctcctgcaccgggacttctccgacgtgggaggctac  aattacgtgtcctggtaccagcaacacccggcaaaagcccaagctgatgatctacgac  gtcagcaacagaccagcggagtgtccaaccggttcagcggctccaagtccggcaaca  ccgcctccctgacctcagcgggcttcaggccgaagatgagcgggattactactgctcct  cgtacacctcaagctcaactctgtacgtgttcggcaccgggtactcagctcaccgtgctgac  cactaccccagcaccgagccacccacccggctcctaccatcgctcccagcctctgt  ccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggctt  gacttcgctgcgatactacatttgggcccccttggctggtacttgcggggctcctgctgctt  tcaactgtgatcactcttactgtaagcgggtcggagaagctgctgtacatcttaagca  accctcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggttccc  agaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgc  tccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag </p>
--	---

		aggagtagcagctgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaag ccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatgg cagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacg acggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatg caggccctgccgcctcgg
Полноразмерная аминокислотная последовательность двойного CAR для CD19- CD22	16	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSG IPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYT FGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIW GSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGGATNFSLLKQAGD VEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGL VKPSQTLTLCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWL GRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSNVDTSKNQYSLQLNA VTPEDTGVYYCARVRLQDGNWSDAFDVWGQTMVT VSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGG YNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYTSSSTLYVFGTGTQLT VLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
CAR для CD19 (с сайтом P2A)	17	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSG IPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYT FGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK

		PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIW GSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSATNFSLLKQAGD VEENPG
CAR для CD22	18	PMALPVTALLLPLALLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQT LSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHR STWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDT GVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMTVTVSSGGG GSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSW YQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDH GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
<b>CG#c230</b>		
Полноразмерная последовательность нуклеиновой кислоты двойного CAR для CD19-CD22	19	atggcacttcccgtcaccgacctgctgctcccactcgcctctcttgcacgccgcccgc cccgaagtgcagctgcagcagtcaggaccgggctggcacaaccttcgagactctgtc cctgacttgcgctataagcggggactccatgctgagcaattcggacacttggacttgatt cgccaaagccccagccgggtctggaatggctgggaaggacctaccatcgtctacttg gtacgacgactacgccagctccgtgcgaggacgcgtgtccatcaacgtggacacctcca agaaccagtactcgttcaactcaacgcagtgacctgaagataccggagtctactattg cgccccgctgcggtccaggacgggaactcctggcggacgcttctgatgtctggggac agggcactatggcaccgtcagctccggcggcggcggtagccaatcggcgtgacaca gccggcttccgctcgggatcgctggacagtcggtgacctctcgtgactggaacctc ctccgacgtggcggtacaattatgtgtcatgtaccagcagcaccgggaaagccc ctaagctgatgatctacgacgtgtccaatagacctagcggggtgtcaaacagattctccgg

atccaaatccggaacactgcctcctgaccattccggactgcaggccgaggacgaag  
 ccgattactactgtcctcttacacctcctcatccaccctctactgtttgggactgggaccc  
 agctgaccgtcctactaccaccccgccccgcggccccctacaccggcaccgactatt  
 gccagccagcctctctcgtcggccggaggcctgcccccagccgccggcggagcc  
 gtgcacacccgcggtctggacttcgcgtgcgatctacatctgggctccgctggccggg  
 acttggcgtgctgctgctgtctctggatcacactgtactgcaagcgcggaagaaaga  
 agctgctctacatctcaagcaaccctcatcggcctgtgcagaccaccaggaagagg  
 atggctgctcctcccgttcccggaggaagaagagggcggatgcgaactgcgcgtgaa  
 gttcagccgaagcggcagccccggcctaccagcagggccagaaccaactgtacaa  
 cgaactcaacctgggtcggagagaagagtacgacgtgctggacaaaagacgcggcag  
 ggaccccgagatgggcggaaagcctcccgaagaaccgcagggaggcctctaca  
 acgagctgcagaaggacaagatggccgaagcctactcagagatcggcatgaaggggg  
 agcggaggcgcgggaagggccacgacggttgtaccaaggacttccactgcgaccaa  
 ggacacctacgatgccctccatgcaagcctgcccccggggtccggagctacca  
 acttctcgtgttgaagcagggcgagatgtcgaggaaaaccgggacctatggcctg  
 ccagtgaccgcctcctgctgccctggctctgctgcttcacgcggccccggcctgagatt  
 gtgatgactcagagcccgccgaccctgtccctgtccccggggagagagcaaccctgt  
 cgtgccgggctcccaagacatctcaaaagtacctcaattggatcagcagaagccagga  
 caggctccacggtgctgatctaccacacttcgagactgcactcaggaatccccgcgcgg  
 tttccgggtccggctccgggaccgactacacctgaccatcagctcgtccagcctgag  
 gatttcgagtgacttctgtcagcaaggaaacaccttcatacaccttcggacagggta  
 ccaagctggaaatcaagggaggaggatctggggcgggttccggaggcgggtg  
 gaagccaagtgcagctccaggaagcggacccgggctggtcaagccgagcgaacc  
 ctctactgactgtactgttccggagtgtccctgcctgactatggagtgctcctggatccg  
 acagcccccgaaaggtctggagtggattggggatctggggctccgaaactacct  
 actaccagagcagcctcaagagccgggtcaccattcaaaaggataactcaagaatcaa  
 gtgtccctgaagctgtcctcagtgacagccgcagacaccgccgtgtactactgcgcaa  
 gcactactactacggaggctcctacgcaatggactactggggacaaggcactttggtcac  
 tgtgtcaagcaccaccacctcgcctcggcctcctaccccggtcccactatcgcgag  
 ccagccgctgagcctgcggcctgaggcttgcgaccggccgctggcggcgcctgcat  
 actcggggcctcactttgcctgtgacatctacatctgggccccctggccggaacgtgc  
 ggagtgtgctgctgtcgtggtcattaccctgtattgaaacgcggaaggaagaagctg  
 ttgtacatttcaagcagccctcatcgcgccgggtgcaaactactcagggaggaagatggct  
 gttcctgtcgggtccccgaagaggaagaaggcggctgcgagttgagggtcaagttctccc  
 ggtccgccgatgctcccctaccaacaggggcagaaccagctttataacgaactgaac

		ctgggcaggagggaggaatatgatgtgttgataagcgcggggccgggaccagaa atgggggggaaagcccagaagaagaaccctcaagagggactttacaacgaattgcaga aagacaaaatggccgagggcctactccgagattgggatgaagggcgaaagacggagag gaaaggggcacgacgggctctaccagggactcagcaccgccaccaaaagatacctacg acgccctgcatatgcaggcgetgccgcgcgc
Полноразмерная аминокислотная последовательность двойного CAR для CD19- CD22	12	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRS TWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTG VYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMTVSSGGGG SQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWY QQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI SGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRSGGATNFSLLKQA GDVEENPGMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPA TSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLI YHTSRLHSGIPARFSGSGGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSSQVQL QESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK GLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTV SSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
CAR для CD22 (с сайтом P2A)	13	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRS TWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTG VYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMTVSSGGGG

		SQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGINVSWY QQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI SGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDH GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGSGATNFSLLKQA GDVEENPG
CAR для CD19	14	PMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSG IPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYT FGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIW GSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

CDR для CD22 и CD19 из двойного CAR или tandemного CAR по настоящему изобретению представлены в таблице 2А.

Таблица 2А. Последовательности CDR для CD22 и CD19

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
<b>CDR для CD22</b>		
HCDR1 (Kabat)	20	SNSDTWN
HCDR2 (Kabat)	21	RTYHRSTWYDDYASSVRG
HCDR3 (Kabat)	22	VRLQDGNSWSDAFDV
HCDR1 (Chothia)	23	GDSMLSNSD
HCDR2 (Chothia)	24	YHRSTWY
HCDR3 (Chothia)	22	VRLQDGNSWSDAFDV
HCDR1 (IMGT)	25	GDSMLSNSDT

HCDR2 (IMGT)	26	TYHRSTWYD
HCDR3 (IMGT)	27	ARVRLQDGNWSWDAFDV
LCDR1 (Kabat)	28	TGTSSDVGGYNYVS
LCDR2 (Kabat)	29	DVSNRPS
LCDR3 (Kabat)	30	SSYTSSSTLYV
LCDR1 (Chothia)	31	TSSDVGGYNY
LCDR2 (Chothia)	32	DVS
LCDR3 (Chothia)	33	YTSSSTLY
LCDR1 (IMGT)	34	SSDVGGYNY
LCDR2 (IMGT)	32	DVS
LCDR3 (IMGT)	30	SSYTSSSTLYV
<b>CDR для CD19</b>		
HCDR1 (Kabat)	35	GVSLPDYGVS
HCDR2 (Kabat)	36	VIWGSETTYYSSSLKS
	37	VIWGSETTYYQSSLKS
	38	VIWGSETTYYNSSLKS
HCDR3 (Kabat)	39	HYYYGGSYAMDY
LCDR1	40	RASQDISKYLN
LCDR2	41	HTSRLHS
LCDR3	42	QQGNTLPYT

В таблице 3А представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности для CD19- и CD22-связывающих доменов из двойного CAR или тандемного CAR, раскрытых в данном документе.

Таблица 3А. CD19- и CD22-связывающие домены

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
scFv CAR19 в c201, c203 и тандемных CAR c171, c182, c188	43	gaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccgggtgagcgcgc aacctgtctgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacag aagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctgg aatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacctcactatca gctcactgcagccagaggacttcgctgtctattctgtcagcaagggaacacctg ccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagc ggaggaggtgggtccggcggagggaagccaggtccaactccaagaaagcg gaccgggtcttgaagccatcagaaactcttactgactgtactgtgagcggag tgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctg gaatggattggagtgattggggctctgagactactactaccaatcatccctcaagt



		cacgcgtcacatctcaaggaactctaagaatcaggtgcactgaaactgcat ctgtgaccgcagccgacaccgccgtgactattgcgctaagcattactattatggcg ggagctacgcaatggattactggggacagggactctggtcaccgtgtccage
	44	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
scFv CAR19 B c224	45	gagattgtcatgactcagccccgccacactcctctgacccggagaaagag caacctgagctgcagggcgtcccaggacatctcgaagtacctgaactgtacca gcagaagcctggacaagcaccgccctcctgatctaccacacctcgcggctgat tcgggaatccccgccagattctcagggagcggatcaggaaccgactacacctg actatctcagcctgcaaccagaggattcgcctgtactctgccagcaaggaaa cacctgccctacaccttggacaggaaccaagctcgagattaaggggggtggt ggatcgggaggggtggatcaggaggagcggctcacaagtccagctgcaaga atcgggtccggacttgaagcctccgaaacctgtactgactgactgtgct cggggtgctattccccgactacggcgtgagctggattcggcagccccctgaaa ggattggaatggatcggcgtgatctggggtcggaaactacctactatcagtcctca ctgaagtcccgcgtgacctcagcaaggataattccaaaaccaagtgtctctgaa gtctccagcgtcactgccgccgatactgccgtgtactactgcgccaagcactact attacggcgggtcgtacccatggactactggggccaagggacactcgtgacctg gtcatcc
	44	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
scFv CAR19 B c227	46	caagtcagctgcaagaatccgggtccggacttgaagcctccgaaacctgt cactgactgactgtgtccgggtgtcattccccgactacggcgtgagctggattc ggcagccccctgaaagggttgaatggatcggcgtgatctggggtcggaaa ctacctactatcagtcctcactgaagtcccgcgtgacctcagcaaggataattcca

		<p>aaaaccaagtgtctctgaagctctccagcgtcactgccgccgatactgccgtgtact actgcgccaagcactactattacggcggttcgtacgccatggactactggggacaa ggcactcttgtgactgtgtcaagcggcgggtggaggagcgggtgggggagggttca ggaggaggcggatcagagatcgtgatgaccaatccccagccaccctgtccctc agccctggagaaagagccaccctgagctgccgggctcccaggatcagcaag tacttgaactggtaccaaaaaagccggggcagggcgggggctcctgatctacc acacctcgcgctccactcaggtatccccgccagattctcaggggagcggctccgg tactgactacacctgactatttctcactgcagccagaggactttgccgtgacttct gccagcagggaaacactctgccgtacacctcgggcaggggaacgaagcttgaaa ttaag</p>
	47	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNS KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSP ATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQKPGQAP RLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTISSLQPEDF AVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK</p>
scFv CAR19 B c230	48	<p>gagattgtgatgactcagagcccggcgacctgtccctgtccccggggagaga gcaacctgtcgtgccgggctccaagacatctcaagctacccaattggtatca gcagaagccaggacaggctccacgggtgctgatctaccacacttcgagactgcac tcaggaatccccgcgcggtttccgggtccggctccgggaccgactacacctgac catcagctcgtccagcctgaggatttcgagtgacttctgtcagaaggaacac cctccatacaccttcggacagggtaccaagctggaaatcaaggaggaggagg atctgggggagggtggtccggaggcgggtggaagccaagtgcagctccaggaaa gcggaccgggctggtcaagccgagcgaaccctctcactgacttgtactgtgtc cggagtgtccctgctgactatggagtgtcctggatccgacagccccggaaag ggctctggagtggattggggtcatctggggctccgaaactactactaccagagca gcctcaagagccgggtcaccattcaagataactccaagaatcaagtgtccctg aagctgtcctcagtgacagccgagacaccgctgtactactgcgccaagcact actactacggaggctcctacgcaatggactactggggacaaggcactttggtcact gtgtcaagc</p>
	44	<p>EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS</p>

		GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS
scFv CAR22 В c201 и c203	49	gaagtgcagctgcagcagtcagggcctggcctggcaagccgctgcagaccctc tcctgacatgcgccattagcggggactccatgctgagcaactcggacacctgga actggattcggcagtcacctcccggggactcagtggtcggacgcacctacca tcggagcacttggtagcagactacgcctcctccgtgagaggtcgcgtgctgatca acgtggataacctgaagaaccagtatagcttgaactgaacgccgtgaccctga ggataccggagtgtactattgtgcgagagtcaggtcgaagacggaaactcctgg tccgacgatttgatgtctggggacagggactatggcacggtgtcatctggagg cggaggatcgaaagcgcctgactcagccggctcggctagcggttaccggg gcagtcctgactatcctgcaccgggactcctccgacgtgggaggctacaatt acgtgtcctggtagcagcaacaccccgcaagcccaagctgatgatctacga cgtagcaacagaccagcggagtgccaaccggtcagcggctccaagtcgg caacaccgctcctgacctcagcgggctcaggccgaagatgaggcggatta ctactgtcctcgtacacctcaagctcaactctgtacgtgtcggcaccggtagcag ctcaccgtgctg
	50	EVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVIYCARVRLQD GNSWSDAFDVGQGMVTVSSGGGGSQSALTQPA SASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSTLYVFGTGTQLTVL
scFv CAR22 В 230	51	gaagtgcagctgcagcagtcaggaccggcctggcaaacctcgcagactctgt ccctgacttgcgtataagcggggactccatgctgagcaattcggacacttggaac tggattcgccaaagccccagccggggtctggaatggctgggaaggacctaccat cgctctacttggtagcagactacgccagctccgtgcgaggacgcgtgtccatcaa cgtggacacctccaagaaccagctactcgttcaactcaacgcagtgaccctgaa gataccggagtctactattgcggccgctgcggctccaggacgggaactcctggt cggacgcttcgatgtctggggacagggcactatggcacccgtcagctccggcgg cggcggtagccaatcggcgtgacacagccggctccgcctcgggatcgcctgg acagtcggtgacctcctgtgactggaacctcctccagctggggcggctacaatt atgtgtcatggtaccagcagcaccgggaagggcccctaagctgatgatctacga cgtgtccaatagacctagcggggtgtcaaacagattctccggatccaatccggaa

		acactgcctcctgaccatttccggactgcaggccgaggacgaagccgattacta ctgtctctttacacctctcatccacctctacgtgtttgggactgggaccagctg accgtcctc
	50	EVQLQQSGPGLVKPSQTLNLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVGQGMVTVSSGGGGSQSALTQPA SASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
scFv CAR22 B 171, c182	52	gaagtgcagcttcaacaatcaggaccaggactcgtcaaacatcacagacctctc cctcatatgtccatctccggggactccatggtgagcaattccgacacttggattg gattagacaaagcccgtcccgggtctggaatggttgggacgcacctaccaccg gtctacttggtagcagactacgcgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaacg tggacacctcaagaaccagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcctgaggat acgggctgctactactgcgcccgcgtccgctgcaagacgggaacagctggagc gatgcattcagatgtctggggccagggaactatggcaccgtgtcgtctgggggcg gtggatcgggtggcgggggttcggggggcggcggtctcagtcctcttacc aaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtgaccatttctgcaccg gcacttcatccgacgtggcggctacaactacgtgtcctgttaccacagcacc gggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaacaggccctcgggagt gtccaaccggtctcgggttcgaaatcgggaaacacagccagcctgaccatcagc ggactgcaggctgaagatgaagccgactactactgctcctctacacctcgtcatc cacgtctacgtgttcggcactggaactcagctgactgtctg
	53	EVQLQQSGPGLVKPSQTLNLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGG GSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQ LTVL
scFv CAR22 B c188	54	cagtcctcttaccacaaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtg accatttctgcaccggcacttcatccgacgtggcggctacaactacgtgtcctg gtaccaacagcaccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaac

		<p>aggccctcgggagtgccaaccgggttctcgggttcgaaatcgggaaacacagcca  gcctgaccatcagcggactgcaggetgaagatgaagccgactactactgctctc  ctacacctgcatccacgctctacgtgttcggcactggaactcagctgactgtgt  ggcggaggaggctccgaagtgcagctcaacaatcaggaccaggactcgtcaa  accatcacagacctctccctcacatgtgccatctccggggactccatgtgagcaa  ttccgacacttgaattggattagacaaagcccgctccggggcttggaatggtgg  gacgcacctaccaccgggtctacttggtagcagactacgcgtcatccgtcgggg  aagagtgtccatcaactggacacctcaagaaccagtacagcctgcagcttaatg  ccgtgactcctgaggatacgggcgtctactactgcgcccgcgtccgctgcaaga  cgggaacagctggagcgtgattcgtgctggggccagggaactatggtcacc  gtgtcgtct</p>
	55	<p>QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS  WYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGN  TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQL  TVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDS  MLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDD  YASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYY  CARVRLQDGNSWSDAFDVWGQTMVTVSS</p>
scFv CAR22 B c224	56	<p>cagtcgctctgactcagccggcctcagcttcggggctccctggcacaagcgtcac  tatttctgtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctgttac  caacagcaccggaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggc  cgtcaggagtgccaacagattctccggctccaagagcggaaactgccagctt  gaccattagcggcttgaggccgaggacgaagccgactactactgctctagctac  acatcctcgtctaccctctacgtgttggaaacggggaccagctgactgtctcggg  ggtggaggatcagaggtgcaactccagcagtcggctcctggcctcgtgaaaccgt  cccaaaccctgtcctgacttgcgccatctcgggcgactccatgtgtccaattccg  acacctggaactggattagacaatcgctagccggggactcgaatggctgggcc  ggacctaccaccggtccacgtggtatgacgactacgcaagctccgtccggggaa  gggtgtccattaacgtcgatacctccaagaaccagtacagccttcagctgaaactg  gtgacccccgaggataccggcgtctactactgtcaagagtgcgattgcaggatg  gaaactcgtggtcggacgattcgtgctggggacagggaactatggtgacctg  gtcctcg</p>
	55	<p>QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS  WYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGN  TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQL</p>

		TVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDS MLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDD YASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYY CARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMTVSS
scFv CAR22 в с227	57	cagtcctctgactcagccggcctcagcttcggggccccctggcacaagegtcac tatttctgtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctgttac caacagcacccccgaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggc cgtcaggagtgtccaacagattctccggctccaagagcggaaactgccagctt gaccattagcggcttgaggccgaggacgaagccgactactactgtctagctac acatctcgtctaccctctacgtgttggaacggggaccagctgactgtgctcggg gggtggaggatcagaggtgcaactccagcagtcggctcctggcctcgtgaaacctg cccaaacctgtccctgacttgcgcatctcgggcgactccatgctgtccaattccg acacctggaactggattagacaatcgcttagccggggactcgaatggctgggccc ggacctaccaccggccacgtggtatgacgactacgcaagctccgtccggggaa gggtgtccattaacgtcgatactccaagaaccagctacgcttcagctgaaacctg gtgacccccgaggataccggcgtctactactgtgcaagagtgcgattgcaggatg gaaactcgtggtcggacgattcgtgctggggacagggaaactatggctactgtg tcctcc
	55	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQL TVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDS MLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDD YASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYY CARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMTVSS

В таблице 4А представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности для дополнительных компонентов CAR, например, сигнального пептида, линкеров и сайтов P2A.

Таблица 4А. Дополнительные компоненты CAR

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
Сигнальный пептид для CAR22 в с201, с203 и тандемных	58	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgct cggccc
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP

CAR c171, c182, c188		
Сигнальный пептид в tandemных CAR c224, c227	60	atggccctgcccgtgactgcgctcctgcttccgttggccctgctcctgcatgccgcc agacct
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид для CAR19 в c201 и c203	61	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgc caggccg
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид для CAR22 в c230	62	atggcacttcccgtcaccgccctgctgctcccactgccctccttctgcacgccgc cgcccc
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид для CAR19 в c230	63	atggccctgccagtgaccgcgctcctgctgccctggctctgctgcttcacgcggc ccggcct
	59	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Шарнирная и трансмембранная область CD8 для CAR22 в c201 и c203 и в tandemных CAR c171, c182, c188, c224, c227	64	accactaccccagcaccgaggccaccaccccggctcctaccatgcctcccag cctctgtcctgctgccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcata ccccgggtcttgacttcgctgcgatatctacattgggcccctctggctggtacttg cggggctcctgctgcttccactcgtgatcactcttactgt
	65	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
Шарнирная и трансмембранная область CD8 для CAR22 в c230	66	actaccaccccggccccgcggccccctaccggcaccgactattgccagccag cctctctcgtgctggccggaggcctgccgcccagccgccggcggagccgtgca caccgcggctctggacttcgctgcgatatctacatctgggctccgctggccggga cttgtggcgtgctgctgctgtctctggcctcacactgtactgc
	65	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
Шарнирная и трансмембранная область CD8	67	accacgacgccagcggcgcgaccaccaacaccggcggccaccatcgcgtcgca ggccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgcagtg cacacgagggggctggacttcgctgtgatctacatctgggcgcccctggccg

для CAR19 в с201 и с203		ggacttgtggggctccttctcctgactggttatcaccccttactgc
	65	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC
Шарнирная и трансмембранн ая область CD8 для CAR19 в с230	68	accaccaccctgcgcctcggcctcctaccccgctcccactatcgcgagccagc cgctgagcctgcggcctgaggctgccgaccggccgctggcggcgccgtgcata ctcggggcctcgactttgcctgtgacatctacatctgggccccctggccggaacg tgcggagtgtgctgctgctgctgctggcattaccctgtattgc
	65	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC
4-1BB для CAR22 в с201 и с203 и тандемных CAR с171, с182, с188, с224, с227	69	aagcgcggctcggagaagctgctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggtcccagaggaggagga aggcggctgcgaactg
	70	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCEL
4-1BB для CAR19 в с201 и с203	71	aaacggggcagaaagaactcctgtatatattcaacaaccattatgagaccagta caactactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaag gaggatgtgaactg
	70	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCEL
4-1BB для CAR22 в с230	72	aagcgcggaagaagaagctgctctacatctcaagcaaccctcatcggcctgt gcagaccaccaggaagaggatggctgctcctgccggtcccggaggaagaag aggcggatgcgaactg
	70	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCEL
4-1BB для CAR19 в с230	73	aaacgcggaaggaagaagctgtgtacatttcaagcagccctcatgcggccgt gcaactactcaggaggaagatggctgttctgctcggttccccgaagaggaagaa ggcggctgcgagttg
	70	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCEL
CD3-дзета для CAR22 в с201 и с203 и	74	cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttgctggagagaggagtacgacgtgctggaca agcggagaggacgggaccagaaatggcgggaagccgcgcagaaagaatc



<p>тандемных CAR 171, с182, с188, с224, с227</p>		<p>cccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctata gcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactg taccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgctcgg</p>
	75	<p>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR</p>
<p>CD3-дзета для CAR19 в с201 и с203</p>	76	<p>agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaa ccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgaca agagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaacc tcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagt gagattgggatgaaaggcagcgcggaggggcaaggggcacgatggccttta ccaggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggcc ctgccccctcgc</p>
	75	<p>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR</p>
<p>CD3-дзета для CAR22 в с230</p>	77	<p>cgcgtgaagttcagccgaagcgcgcacgccccggcctaccagcagggccagaa ccaactgtacaacgaactcaacctgggtcggagagaagagtacgacgtgctgga caaaagacgcggcagggacccccgagatgggcggaaagcctcggcgaagaac ccgcaggaggcctctacaacgagctgcagaaggacaagatggccgaagccta ctcagagatcggcatgaagggggagcggaggcgcgggaagggccacgacggt ttgtaccaaggactttcactgcgaccaaggacacctacgatgcctccatatgcaa gcctgccgccccgg</p>
	75	<p>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR</p>
<p>CD3-дзета для CAR19 в с230</p>	78	<p>agggtcaagttctcccgtccgccgatgctcccctaccaacaggggcagaac cagctttataacgaactgaacctgggcaggaggagggaatgatgtgttgataa gcgccggggccgggaccagaaatggggggaaagcccagaagaagaaccct caagagggactttacaacgaattgcagaaagacaaaatggccgaggcctactccg agattgggatgaaggccgaagacggagaggaaaggggcacgacgggctcta</p>

		ccagggactcagcaccgccaccaagatacctacgacgcctgcatatgcaggc gctgccgccgcgc
	75	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
Линкер между scFv в c171	79	ttggcagaagccgccgcaaa
	80	LAEAAAK
Линкер между scFv в c182, c188	81	ggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggagggaagc
	82	GGGSGGGSGGGGS
Линкер между scFv в c224	83	ggcggagggcgggagcggaggaggagctctggcggaggaggaagc
	82	GGGSGGGSGGGGS
Линкер между scFv в c227	84	ggcggaggagctcggggggggcggctcaggaggagggcggctca
	82	GGGSGGGSGGGGS
P2A в c201, c203	85	ggaagcggagctactaactcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggag aacctggacct
	86	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
P2A в c230	87	ggttccggagctaccaacttctcgtgtgaagcaggccggagatgctcaggaaa accgggacct
	86	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
Линкер Gly4Ser	88	Ggtggaggtggcagc
	89	GGGGS

Таблица 5А. Дополнительные CD19-связывающие домены и другие последовательности

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
Домен scFv CAR19-1	90	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGSGGGGSQVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYYS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS

Домен scFv CAR19-2	91	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQDISKYLWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ QGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ PPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQGLVTVSSHHHHHHHH
Полный CAR для CAR19-2 (с сигнальным пептидом)	92	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQDISKYLWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ QGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV QLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ PPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQGLVTVSSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR
Полный CAR для CAR19-2	93	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSSTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

Домен CAR19-3	scFv 94	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSW IRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSSSLKSRVTISKDN SKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQS PATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQKPGQA PRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK
Домен CAR19-5	scFv 95	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSET TYYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAV YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
Домен CAR19-6	scFv 96	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSET TYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAV YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
Домен CAR19-7	scFv 97	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSW IRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSSSLKSRVTISKDN SKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEI VMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK
Домен CAR19-8	scFv 98	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSW IRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDN SKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAM DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEI VMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK

Домен CAR19-9	scFv  99	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSET TYYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAV YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLLVTVSS
Домен CAR19-10	scFv  100	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNS KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIV MTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQK PGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK
Домен CAR19-11	scFv  101	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGTLLVTVSS
Домен CAR19-12	scFv  102	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNS KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSP ATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAP RLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDF AVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK
Полный для CAR19-A	CAR  103	MLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLG DRV TISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ QGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNS KSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMD

		<p>YWGQGTSTVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIH  VKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV  TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY  QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY  NELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQE  GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLY  QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
Домен CAR19-A	scFv 104	<p>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQ  QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT  ISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSG  SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCT  VSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTY  NSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTTDDTAIYYCA  KHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS</p>
Полный для CAR19-B	CAR 105	<p>MLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLG  DRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTS  RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ  QGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE  VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI  RQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNS  KSQVFLKMNSLQTTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMD  YWGQGTSTVTVSSSESKYGPPCPPCFWVLVVVGGV  LACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ  TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ  QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGK  PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG  KGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
Домен CAR19-B	scFv 106	<p>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQ  QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT  ISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSG  SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCT  VSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTY  NSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTTDDTAIYYCA  KHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS</p>
Сигнальный	107	MLLVTSLLLCELPHPAFLIP

пептид		
CD3-дзета	108	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR

#### Тандемные CAR

В одном аспекте в данном документе раскрыты CAR, содержащие биспецифический антигенсвязывающий домен, например, тандемные CAR. В некоторых вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий домен содержит два антигенсвязывающих домена, например, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления тандемный CAR содержит биспецифический антигенсвязывающий домен, содержащий антигенсвязывающий домен для CD22 и антигенсвязывающий домен для CD19.

В некоторых вариантах осуществления биспецифического антигенсвязывающего домена первый антигенсвязывающий домен представляет собой молекулу антитела, например, связывающий домен антитела (например, scFv). В некоторых вариантах осуществления биспецифического антигенсвязывающего домена второй антигенсвязывающий домен представляет собой молекулу антитела, например, связывающий домен антитела (например, scFv). В пределах каждой молекулы антитела, например, scFv, биспецифического антигенсвязывающего домена VH может находиться выше или ниже VL.

В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела (например, scFv), находящиеся выше, организованы таким образом, что их VH (VH1) находится выше их VL (VL1), и антитело или фрагмент антитела (например, scFv), находящиеся ниже, организованы таким образом, что их VL (VL2) находится выше VH (VH2), так что в целом молекула биспецифического антитела характеризуется следующей организацией в ориентации от N- к C-концу: VH1-VL1-VL2-VH2.

В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела (например, scFv), находящиеся выше, организованы таким образом, что их VL (VL1) находится выше их VH (VH1), и антитело или фрагмент антитела (например, scFv), находящиеся ниже, организованы таким образом, что их VH (VH2) находится выше их VL (VL2), так что в целом молекула биспецифического антитела характеризуется следующей организацией в ориентации от N- к C-концу: VL1-VH1-VH2-VL2.

В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела (например, scFv), находящиеся выше, организованы таким образом, что их VL (VL1) находится выше их VH (VH1), и антитело или фрагмент антитела (например, scFv), находящиеся ниже, организованы таким образом, что их VL (VL2) находится выше их VH (VH2), так что в целом молекула биспецифического антитела характеризуется следующей организацией в ориентации от N- к C-концу: VL1-VH1-VL2-VH2.

В еще одних вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела (например, scFv), находящиеся выше, организованы таким образом, что их VH (VH1) находится выше их VL (VL1), и антитело или фрагмент антитела (например, scFv), находящиеся ниже, организованы таким образом, что их VH (VH2) находится выше их VL (VL2), так что в целом молекула биспецифического антитела характеризуется следующей организацией в ориентации от N- к C-концу: VH1-VL1-VH2-VL2.

В любой из вышеупомянутых конфигураций линкер необязательно располагается между двумя антителами или фрагментами антител (например, scFv), например, между VL1 и VL2, если конструкция организована как VH1-VL1-VL2-VH2; между VH1 и VH2, если конструкция организована как VL1-VH1-VH2-VL2; между VH1 и VL2, если конструкция организована как VL1-VH1-VL2-VH2; или между VL1 и VH2, если конструкция организована как VH1-VL1-VH2-VL2. Обычно линкер между двумя scFv должен иметь достаточную длину для предотвращения неправильного спаривания между доменами двух scFv. Линкер может представлять собой линкер, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер (Gly4-Ser)<sub>n</sub>, где n составляет 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (Gly4-Ser)<sub>n</sub>, где n=1, например, линкер имеет аминокислотную последовательность Gly4-Ser. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (Gly4-Ser)<sub>n</sub>, где n= 4 (SEQ ID NO: 82). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит, например, состоит из аминокислотной последовательности LAEAAAK (например, SEQ ID NO: 80).

В любой из вышеуказанных конфигураций линкер необязательно располагается между VL и VH первого scFv. Линкер необязательно располагается между VL и VH второго scFv. В конструкциях, которые имеют несколько линкеров, любые два или более линкера могут быть одинаковыми или разными. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления биспецифический CAR содержит VL, VH и необязательно один или несколько линкеров, организованных согласно описанному в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления каждая молекула антитела, например каждый антигенсвязывающий домен (например, каждый scFv), содержит линкер между областями VH и VL. В некоторых вариантах осуществления линкер между областями VH и VL представляет собой линкер (Gly4-Ser)<sub>n</sub>, где n составляет 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (Gly4-Ser)<sub>n</sub>, где n=1, например, линкер имеет аминокислотную последовательность Gly4-Ser. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой (Gly4-Ser)<sub>n</sub>, где n= 4 (SEQ ID NO: 82). В некоторых вариантах осуществления VH- и VL-области соединены без линкера.

#### Разделенный CAR

В некоторых вариантах осуществления в клетке, экспрессирующей CAR, используется разделенный CAR. Подход с разделенным CAR более подробно описан в публикациях согласно PCT WO2014/055442 и WO2014/055657, включенных в данный документ посредством ссылки. Вкратце, система разделенного CAR содержит клетку,



экспрессирующую первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен и костимулирующий домен (например, 4-1BB), и эта клетка также экспрессирует второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен (например, CD3-дзета). Когда клетка встречается с первым антигеном, то активируется костимулирующий домен, и клетка пролиферирует. Когда клетка встречается со вторым антигеном, то активируется внутриклеточный сигнальный домен, и запускается активность уничтожения клеток. Таким образом, клетка, экспрессирующая CAR, полностью активируется только в присутствии обоих антигенов.

#### Трансфекция РНК

В данном документе раскрыты способы получения транскрибированной *in vitro* РНК, кодирующей CAR. Настоящее изобретение также охватывает РНК-конструкцию, кодирующую CAR, которую можно вводить путем прямой трансфекции в клетку. Способ создания мРНК для применения в трансфекции может предусматривать транскрипцию *in vitro* (IVT) матрицы с использованием специально разработанных праймеров с последующим добавлением поли(А) с получением конструкции, содержащей 3'- и 5'-нетранслируемую последовательность ("UTR"), 5'-кэп и/или сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, которая подлежит экспрессии, и поли(А)-хвост, как правило, длиной 50-2000 оснований. С помощью РНК, полученной таким образом, можно эффективно трансфицировать различные типы клеток. В одном аспекте матрица содержит последовательности для CAR.

В одном аспекте CAR, например, двойной CAR или тандемный CAR, кодируется матричной РНК (мРНК). В одном аспекте мРНК, кодирующую CAR, например, двойной CAR или тандемный CAR, вводят в иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или НК-клетку, для получения клетки, экспрессирующей CAR, например, CAR-Т-клетки или НК-клетки с CAR.

В одном варианте осуществления транскрибированную *in vitro* РНК, кодирующую CAR, можно вводить в клетку в форме временной трансфекции. РНК получают путем транскрипции *in vitro* с применением матрицы, полученной посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). Представляющая интерес ДНК из любого источника может быть непосредственно преобразована с помощью ПЦР в матрицу для синтеза мРНК *in vitro* с применением соответствующих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может быть, например, геномная ДНК, плазмидная ДНК, фаговая ДНК, кДНК, синтетическая последовательность ДНК или любой другой подходящий источник ДНК. Требуемой матрицей для *in vitro* транскрипции является CAR по настоящему изобретению. Например, матрица для РНК CAR содержит внеклеточную область, содержащую одноцепочечный вариабельный домен противоопухолевого антитела; шарнирную область, трансмембранный домен (например, трансмембранный домен CD8a) и цитоплазматическую область, которая включает внутриклеточный сигнальный домен, например, содержащий сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB.

В одном варианте осуществления ДНК, подлежащая применению в ПЦР, содержит

открытую рамку считывания. ДНК может происходить из встречающейся в природе последовательности ДНК из генома организма. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может содержать некоторые или все из 5'- и/или 3'-нетранслируемых областей (UTR). Нуклеиновая кислота может содержать экзоны и интроны. В одном варианте осуществления ДНК, подлежащая применению в ПЦР, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты человека. В другом варианте осуществления ДНК, подлежащая применению в ПЦР, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты человека, содержащую 5'- и 3'-UTR. В качестве альтернативы ДНК может представлять собой искусственную последовательность ДНК, которая в норме не экспрессируется у организма, встречающегося в природе. Иллюстративная искусственная последовательность ДНК представляет собой последовательность, которая содержит части генов, которые лигированы вместе с образованием открытой рамки считывания, которая кодирует слитый белок. Части ДНК, которые лигированы вместе, могут происходить из одного организма или из более чем одного организма.

ПЦР применяют для получения матрицы, предназначенной для транскрипции *in vitro* мРНК, которая применяется для трансфекции. Способы выполнения ПЦР хорошо известны в данной области техники. Праймеры для применения в ПЦР разрабатывают таким образом, что они имеют области, которые по существу комплементарны областям ДНК, которые будут использоваться в качестве матрицы для ПЦР. Используемое в данном документе, "по существу комплементарный" относится к последовательностям нуклеотидов, где большинство или все основания в последовательности праймера являются комплементарными, или одно или несколько оснований являются некомплементарными или несовпадающими. По существу комплементарные последовательности могут подвергаться отжигу или гибридизоваться с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях отжига, применяемых для ПЦР. Праймеры можно разрабатывать таким образом, чтобы они были по существу комплементарными любой части ДНК-матрицы. Например, праймеры можно разрабатывать таким образом, чтобы амплифицировать часть нуклеиновой кислоты, которая в норме транскрибируется в клетках (открытая рамка считывания), включая 5'- и 3'-UTR. Праймеры также можно разрабатывать таким образом, чтобы амплифицировать часть нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный домен, представляющий интерес. В одном варианте осуществления праймеры разработаны таким образом, чтобы амплифицировать кодирующую область кДНК человека, в том числе все или части 5'- и 3'-UTR. Праймеры, применимые для ПЦР, могут быть получены посредством способов синтеза, которые хорошо известны в данной области техники. "Прямые праймеры" представляют собой праймеры, которые содержат область из нуклеотидов, по существу комплементарных нуклеотидам в ДНК-матрице, которые находятся выше последовательности ДНК, подлежащей амплификации. "Находится выше" используется в данном документе для обозначения местоположения последовательности ДНК, подлежащей амплификации, в направлении 5' относительно кодирующей нити. "Обратные праймеры" представляют

собой праймеры, которые содержат область из нуклеотидов, которые по существу комплементарны двухнитевой ДНК-матрице, которая находится ниже последовательности ДНК, подлежащей амплификации. "Находится ниже" используется в данном документе для обозначения местоположения последовательности ДНК, подлежащей амплификации, в направлении 3' относительно кодирующей нити.

В способах, раскрытых в данном документе, может применяться любая ДНК-полимераза, пригодная для ПЦР. Реагенты и полимеразы коммерчески доступны из целого ряда источников.

Также можно использовать химические структуры, способные обеспечивать стабильность и/или эффективность трансляции. РНК предпочтительно содержит 5'- и 3'-UTR. В одном варианте осуществления длина 5'-UTR составляет от одного до 3000 нуклеотидов. Длина последовательностей 5'- и 3'-UTR, которые должны быть добавлены к кодирующей области, может быть изменена с помощью различных способов, в том числе без ограничения путем разработки праймеров для ПЦР, которые отжигаются с различными областями UTR. Используя данный подход, специалист средней квалификации в данной области техники может модифицировать длину 5'- и 3'-UTR, необходимую для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

5'- и 3'-UTR могут представлять собой встречающиеся в природе эндогенные 5'- и 3'-UTR для представляющей интерес нуклеиновой кислоты. В качестве альтернативы последовательности UTR, которые не являются эндогенными для представляющей интерес нуклеиновой кислоты, могут быть добавлены путем включения последовательностей UTR в прямой и обратный праймеры или с помощью любых других модификаций матрицы. Применение последовательностей UTR, которые не являются эндогенными для представляющей интерес нуклеиновой кислоты, может быть применимым для модифицирования стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что элементы с высоким содержанием AU в последовательностях 3'-UTR могут снижать стабильность мРНК. Следовательно, 3'-UTR могут быть выбраны или разработаны таким образом, чтобы они увеличивали стабильность транскрибированной РНК на основе свойств UTR, которые хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте осуществления 5'-UTR может содержать последовательность Козак из эндогенной нуклеиновой кислоты. В качестве альтернативы, если 5'-UTR, которая не является эндогенной для представляющей интерес нуклеиновой кислоты, добавляют с помощью ПЦР, как описано выше, консенсусная последовательность Козак может быть видоизменена путем добавления последовательности 5'-UTR. Последовательности Козак могут увеличивать эффективность трансляции некоторых РНК-транскриптов, но, по-видимому, они не являются необходимыми для обеспечения эффективной трансляции всех РНК. О необходимости наличия последовательностей Козак во многих мРНК известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR может представлять собой 5'-UTR РНК вируса, РНК-геном

которого стабилен в клетках. В некоторых вариантах осуществления для предотвращения разрушению мРНК экзонуклеазой в 3'- или 5'-UTR можно использовать различные аналоги нуклеотидов.

Для обеспечения возможности синтеза РНК из ДНК-матрицы без необходимости клонирования гена, промотор транскрипции должен быть присоединен к ДНК-матрице выше последовательности, подлежащей транскрипции. Если последовательность, которая функционирует в качестве промотора для РНК-полимеразы, добавляют к 5'-концу прямого праймера, промотор РНК-полимеразы включается в продукт ПЦР выше открытой рамки считывания, которая подлежит транскрипции. В одном предпочтительном варианте осуществления промотор представляет собой промотор T7-полимеразы, как описано в другом разделе данного документа. Другие применимые промоторы включают без ограничения промоторы для РНК-полимераз T3 и SP6. Консенсусные последовательности нуклеиновой кислоты для промоторов T7, T3 и SP6 известны в данной области техники.

В предпочтительном варианте осуществления мРНК содержит как кэп на 5'-конце, так и 3'-поли(А) хвост, которые определяют связывание с рибосомой, инициацию трансляции и стабильность мРНК в клетке. На кольцевой ДНК-матрице, например плазмидной ДНК, РНК-полимераза продуцирует длинный конкатамерный продукт, который не подходит для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линеаризованной на 3'-конце UTR, приводит к образованию мРНК нормального размера, которая не эффективна для эукариотической трансфекции, даже в случае ее полиаденилирования после транскрипции.

На линейной ДНК-матрице РНК-полимераза фага T7 может удлинять 3'-конец транскрипта за пределы последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)).

Традиционный способ интеграции отрезков поли(А)/(Т) в ДНК-матрицу представляет собой молекулярное клонирование. Однако последовательность поли(А)/(Т), интегрированная в плазмидную ДНК, может вызывать нестабильность плазмиды, поэтому плазмидные ДНК-матрицы, полученные из бактериальных клеток, зачастую сильно испорчены делециями и другими абберрациями. Это делает процедуры клонирования не только трудоемкими и длительными, но зачастую и ненадежными. Поэтому способ, который позволяет конструировать ДНК-матрицы с 3'-участками поли(А)/(Т) без клонирования, является крайне желательным.

Сегмент поли(А)/(Т) транскрипционной ДНК-матрицы может быть получен в ходе ПЦР с использованием обратного праймера, содержащего поли(Т)-хвост, такой как хвост из 100Т (размер может составлять 50-5000 Т), или после ПЦР любым другим способом, в том числе без ограничения лигированием ДНК или рекомбинацией *in vitro*. Поли(А)-хвосты также обеспечивают стабильность РНК и уменьшают их разрушение. Как правило, длина поли(А)-хвоста положительно коррелирует со стабильностью транскрибированной РНК. В одном варианте осуществления длина поли(А)-хвоста составляет от 100 до 5000

аденозиновых остатков.

Поли(А)-хвосты РНК могут быть дополнительно удлинены после транскрипции *in vitro* с применением поли(А)-полимеразы, такой как поли(А)-полимераза *E. coli* (E-PAP). В одном варианте осуществления увеличение длины поли(А)-хвоста от 100 нуклеотидов до 300-400 нуклеотидов приводит к приблизительно двукратному повышению эффективности трансляции РНК. Кроме того, стабильность мРНК может увеличить присоединение различных химических групп к 3'-концу. Такое присоединение может включать присоединение модифицированных/искусственных нуклеотидов, аптамеров и других соединений. Например, в состав поли(А)-хвоста с помощью поли(А)-полимеразы могут быть аналоги АТФ. Аналоги АТФ могут дополнительно увеличивать стабильность РНК.

5'-кэпы также обеспечивают стабильность молекул РНК. В предпочтительном варианте осуществления РНК, полученные с помощью способов, раскрытых в данном документе, содержат 5'-кэп. 5'-кэп получают с применением методик, известных в данной области техники и описанных в данном документе (Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005)).

РНК, полученные с помощью способов, раскрытых в данном документе, также могут содержать последовательность сайта внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES может быть любой вирусной, хромосомной или искусственно сконструированной последовательностью, которая инициирует независимое от кэпа связывание рибосомы с мРНК и облегчает инициацию трансляции. Могут быть включены любые растворенные вещества, подходящие для электропорации клеток, которые могут содержать факторы, способствующие проницаемости и жизнеспособности клеток, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества.

РНК может быть введена в целевые клетки с использованием любого из ряда различных способов, например, коммерчески доступных способов, которые включают без ограничения электропорацию (Amaha Nucleofector-II (Amaha Biosystems, Кельн, Германия)), (ECM 830 (VTX) (Harvard Instruments, Бостон, Массачусетс, США) или Gene Pulser II (BioRad, Денвер, Колорадо, США), Multiporator (Eppendorf, Гамбург, Германия), трансфекцию, опосредованную катионной липосомой с использованием липофекции, полимерную инкапсуляцию, опосредованную пептидом трансфекцию или биолистические системы доставки частиц, такие как "генные пушки" (см., например, Nishikawa, et al. *Hum Gene Ther.*, 12 (8):861-70 (2001)).

#### Невирусные способы доставки

В некоторых аспектах можно применять невирусные способы для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в данном документе, в клетку, или ткань, или организм субъекта.

В некоторых вариантах осуществления невирусный способ включает применение транспозона (также называемого мобильным генетическим элементом). В некоторых

вариантах осуществления транспозон представляет собой фрагмент ДНК, который может самостоятельно вставляться в определенное местоположение в геноме, например, фрагмент ДНК, который способен к саморепликации и вставке своей копии в геном, или фрагмент ДНК, который с помощью сплайсинга может быть вырезан из более длинной нуклеиновой кислоты и вставлен в другое место в геноме. Например, транспозон содержит последовательность ДНК, состоящую из инвертированных повторов, фланкирующих гены для транспозиции.

Иллюстративные способы доставки нуклеиновых кислот с применением транспозона включают систему транспозонов Sleeping Beauty (SBTS) и систему транспозонов piggyBac (PB). См., например, Aronovich et al. *Hum. Mol. Genet.* 20.R1(2011):R14-20; Singh et al. *Cancer Res.* 15(2008):2961-2971; Huang et al. *Mol. Ther.* 16(2008):580-589; Grabundzija et al. *Mol. Ther.* 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al. *Blood.* 122.21(2013):166; Williams. *Molecular Therapy* 16.9(2008):1515-16; Bell et al. *Nat. Protoc.* 2.12(2007):3153-65; и Ding et al. *Cell.* 122.3(2005):473-83, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

SBTS включает два компонента: 1) транспозон, содержащий трансен, и 2) источник фермента транспозазы. Транспозаза может переносить транспозон из плазмиды-носителя (или другой донорной ДНК) в целевую ДНК, такую как хромосома/геном клетки-хозяина. Например, транспозаза связывается с плазмидой-носителем/донорной ДНК, вырезает транспозон (включающий трансен(-ы)) из плазмиды и вставляет его в геном клетки-хозяина. См., например, Aronovich et al.

Иллюстративные транспозоны включают транспозон на основе pT2. См., например, Grabundzija et al. *Nucleic Acids Res.* 41.3(2013):1829-47 и Singh et al. *Cancer Res.* 68.8(2008): 2961-2971, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. Иллюстративные транспозазы включают транспозазу типа Tc1/mariner, например транспозазу SB10 или транспозазу SB11 (гиперактивная транспозаза, которая может быть экспрессирована, например, с участием промотора цитомегаловируса). См., например, Aronovich et al.; Kebriaei et al. и Grabundzija et al., все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Применение SBTS обеспечивает эффективную интеграцию и экспрессию трансгена, например, нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в данном документе. В данном документе представлены способы получения клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, которая стабильно экспрессирует CAR, описанный в данном документе, например, с применением системы транспозонов, такой как SBTS.

В соответствии со способами, описанными в данном документе, в некоторых вариантах осуществления одна или несколько нуклеиновых кислот, например, плазмиды, содержащие компоненты SBTS, доставляются в клетку (например, Т- или НК-клетку). Например, нуклеиновую(-ые) кислоту(-ы) доставляют с помощью стандартных способов доставки нуклеиновой кислоты (например, плазмидной ДНК), например, с помощью описанных в данном документе способов, например, электропорации, трансфекции или

липофекции. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит транспозон, содержащий трансген, например, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит транспозон, содержащий трансген (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, описанный в данном документе), а также последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент транспозазу. В некоторых вариантах осуществления предусмотрена система с двумя нуклеиновыми кислотами, например, система с двумя плазмидами, например, где первая плазида содержит транспозон, содержащий трансген, и вторая плазида содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент транспозазу. Например, первая и вторая нуклеиновые кислоты совместно доставляются в клетку-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления клетки, например Т- или НК-клетки, которые экспрессируют CAR, описанный в данном документе, получают с использованием комбинации вставки гена с помощью SBTS и генетического редактирования с помощью нуклеазы (например, нуклеаз с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), системы CRISPR/Cas или сконструированной мегануклеазы, повторно сконструированной хоуминг-эндонуклеазы).

В некоторых вариантах осуществления применение невирусного способа доставки делает возможным перепрограммирование клеток, например, Т- или НК-клеток, и прямую инфузию клеток в организм субъекта. Преимущества невирусных векторов включают без ограничения простоту и относительно низкую стоимость производства достаточных количеств, необходимых для удовлетворения требований в отношении популяции пациентов, стабильности при хранении и отсутствия иммуногенности.

#### Конструкции нуклеиновых кислот, кодирующие CAR

В настоящем изобретении также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие одну или несколько конструкций CAR, описанных в данном документе. В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты предусмотрена в виде транскрипта, представляющего собой матричную РНК. В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты предусмотрена в виде ДНК-конструкции.

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие требуемые молекулы, можно получить с применением рекомбинантных способов, известных в данной области техники, таких как, например, путем скрининга библиотек от клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, который, как известно, включает его, или путем непосредственного выделения из клеток и тканей, содержащих их, с применением стандартных методик. В качестве альтернативы представляющий интерес ген может быть получен синтетическим путем, а не клонирован.

В настоящем изобретении также предусмотрены векторы, в которые вставлена ДНК по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного

переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом по сравнению с векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, заключающемся в том, что ими можно трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом, заключающимся в низкой иммуногенности.

В другом варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую требуемый CAR по настоящему изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В другом варианте осуществления экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, можно достичь с помощью транспозонов, таких как *sleeping beauty*, *crisper*, *CAS9* и нуклеазы с "цинковыми пальцами". См. ниже June et al. 2009 *Nature Reviews Immunology* 9.10: 704-716, включенный в данный документ посредством ссылки.

Вкратце, экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, как правило, достигается путем образования функциональной связи нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его части, с промотором и включения конструкции в состав вектора экспрессии. Векторы могут подходить для репликации и интеграции у эукариот. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, применимые для регуляции экспрессии требуемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Конструкции экспрессии по настоящему изобретению также можно использовать для иммунизации и генной терапии нуклеиновыми кислотами с использованием стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5399346, 5580859, 5589466, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор для генной терапии.

Нуклеиновую кислоту можно клонировать в векторы множества типов. Например, нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, включающий без ограничения плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животных и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы для создания зондов и векторы для секвенирования.

Кроме того, вектор экспрессии можно обеспечивать для клетки в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al., 2012, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, применимые в качестве векторов, включают без ограничения ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы и лентивирусы. Обычно подходящий вектор содержит точку начала



репликации, функциональную в по меньшей мере одном организме, промоторную последовательность, подходящие сайты для рестрикции эндонуклеазой и один или несколько селективируемых маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058 и патент США № 6326193).

Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан целый ряд систем на основе вирусов. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно вставить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы с помощью методик, известных в данной области техники. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и доставить в клетки субъекта *in vivo* либо *ex vivo*. В данной области техники известен целый ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используют аденовирусные векторы. В данной области техники известен целый ряд аденовирусных векторов. В одном варианте осуществления используют лентивирусные векторы.

Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области на 30-110 п. о. выше сайта начала транскрипции, хотя было показано, что целый ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта начала транскрипции. Расстояние между промоторными элементами часто является гибким, так что функция промотора сохраняется при инверсии элементов или их перемещении друг относительно друга. В промоторе гена тимидинкиназы (tk) промежуток между промоторными элементами можно увеличить до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать для активации транскрипции либо совместно, либо независимо. Иллюстративные промоторы включают промоторы генов IE CMV, EF-1 $\alpha$ , убиквитина С или фосфоглицерокиназы (PGK).

Примером промотора, который способен обеспечивать экспрессию трансгена CAR в Т-клетке млекопитающего, является промотор гена EF1-альфа (EF1 $\alpha$ ). Нативный промотор гена EF1 $\alpha$  управляет экспрессией альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментативную доставку аминоацил-тРНК к рибосоме. Промотор гена EF1 $\alpha$  был широко использован в плаزمидях экспрессии для клеток млекопитающих, и было показано, что он эффективно управляет экспрессией CAR с трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор. См., например, Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). В одном аспекте промотор гена EF1 $\alpha$  содержит последовательность, известную в данной области техники.

Другим примером промотора является последовательность немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность является последовательностью сильного конститутивного промотора, способного управлять экспрессией любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней, на высоких уровнях. Однако можно также использовать последовательности других конститутивных промоторов, в том числе без ограничения раннего промотора вируса обезьян 40 (SV40), промотора вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV),

промотора длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (HIV), промотора MoMuLV, промотора вируса лейкоза птиц, немедленно-раннего промотора вируса Эпштейна-Барр, промотора вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, без ограничения, промотор гена актина, промотор гена миозина, промотор гена фактора элонгации-1 $\alpha$ , промотор гена гемоглобина и промотор гена креатинкиназы. Кроме того, настоящее изобретение не должно ограничиваться применением конститутивных промоторов. Индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Применение индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, если такая экспрессия требуется, или отключать экспрессию, если экспрессия не требуется. Примеры индуцируемых промоторов включают без ограничения металлотионеин-индуцируемый промотор, глюкокортикоид-индуцируемый промотор, прогестерон-индуцируемый промотор и тетрациклин-индуцируемый промотор.

Для оценки экспрессии полипептида CAR или его частей вектор экспрессии, подлежащий введению в клетку, также может содержать либо селективируемый маркерный ген или репортерный ген, либо их оба для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые стремились трансфицировать или инфицировать посредством вирусных векторов. В других аспектах селективируемый маркер может переноситься на отдельном фрагменте ДНК и использоваться в процедуре котрансфекции. Как селективируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Применимые селективируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т. п.

Репортерные гены используют для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценивания функциональных возможностей регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который отсутствует или не экспрессируется в организме- или ткани-реципиенте и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется в некотором легко выявляемом свойстве, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретлируемую щелочную фосфатазу, или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных методик или приобретены коммерческим путем. В целом конструкцию с минимальной 5'-фланкирующей областью, демонстрирующую наивысший уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируют как промотор. Такие промоторные области можно связывать с репортерным геном и использоваться для оценивания средств в отношении способности к модулированию транскрипции,

управляемой промотором.

Способы введения генов в клетку и обеспечения их экспрессии в ней известны из уровня техники. Что касается вектора экспрессии, то вектор можно легко ввести в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым способом, известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии можно перенести в клетку-хозяина физическим, химическим или биологическим способом.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т. п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция с использованием фосфата кальция.

Биологические способы введения полинуклеотида, представляющего интерес, в клетку-хозяина включают применение векторов на основе ДНК и РНК. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко применяемым способом вставки генов в клетки млекопитающего, например, человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. См., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362.

Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, микрогранулы и системы на основе липидов, в том числе эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Иллюстративной коллоидной системой для применения в качестве средства для доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственная мембранная везикула). В данной области техники доступны другие способы целенаправленной доставки нуклеиновых кислот, такие как доставка полинуклеотидов с помощью нацеливающихся наночастиц или другой подходящей системы доставки субмикронного размера.

В случае использования системы доставки, отличной от вирусной, иллюстративным средством для доставки является липосома. Для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*) предполагается применение липидных составов. В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть ассоциирована с липидом. Нуклеиновая кислота, ассоциированная с липидом, может быть инкапсулирована в водной внутренней части липосомы, вкраплена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме посредством связывающей молекулы, которая ассоциирована как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захвачена в липосому, образовывать комплекс с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, содержаться в виде суспензии в липиде,

содержаться в мицелле или образовывать комплекс с ней или иным образом быть ассоциированной с липидом. Композиции для ассоциации на основе липида, липида/ДНК или липида/вектора экспрессии не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в двухслойной структуре, в виде мицелл или в "сжатой" структуре. Они также могут быть просто вкраплены в раствор, возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными по размеру или форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут представлять собой встречающиеся в природе или синтетические липиды. Например, липиды включают жировые капли, которые в природных условиях встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминспирты и альдегиды.

Подходящие для применения липиды можно получить из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин ("DMPC") можно получить от Sigma, Сент-Луис, Миссури, США; дицетилфосфат ("DCP") можно получить от K & K Laboratories (Плейнвью, Нью-Йорк, США); холестерин ("Choi") можно получить от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды можно получить от Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама, США). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре приблизительно  $-20^{\circ}\text{C}$ . Хлороформ используется в качестве единственного растворителя, поскольку он испаряется легче, чем метанол. "Липосома" является общим термином, охватывающим различные одно- и мультиламеллярные липидные носители, образованные путем формирования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы могут быть охарактеризованы как имеющие везикулярные структуры с мембраной, представляющей собой фосфолипидный бислой, и внутренней водной средой. Мультиламеллярные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются самопроизвольно при суспендировании фосфолипидов в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоорганизации перед образованием замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991, *Glycobiology* 5: 505-10). Однако также охватываются композиции, которые имеют другие структуры в растворе, отличные от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать вид мицеллярной структуры или просто существовать в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также подразумеваются комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Чтобы подтвердить присутствие последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине, можно выполнять различные анализы, независимо от способа, применяемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина, или иного воздействия ингибитора по настоящему изобретению в отношении клетки. Такие анализы включают, например, "молекулярно-биологические" анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как Саузерн и нозерн-блоттинг, RT-PCR и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как выявление присутствия или отсутствия

конкретного пептида, например, с помощью иммунологических средств (ELISA и вестерн-блоттинг) или с помощью описанных в данном документе анализов для идентификации средств, попадающих в объем настоящего изобретения.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR. В одном аспекте вектор CAR можно вводить путем прямой трансдукции в клетку, например Т-клетку или НК-клетку. В одном аспекте вектор представляет собой вектор клонирования или экспрессии, например, вектор, включающий без ограничения одну или несколько плазмид (например, плазмиды экспрессии, векторы клонирования, миникольца, минивекторы, двойные микрохромосомы), векторные конструкции на основе ретровирусов и лентивирусов. В одном аспекте вектор способен экспрессировать конструкцию CAR в Т-клетках или НК-клетках млекопитающих. В одном аспекте Т-клетка млекопитающего представляет собой Т-клетку человека.

#### Способы изготовления/получения

В настоящем изобретении также предусмотрены способы получения клетки, раскрытой в данном документе, например, способы конструирования Т-клетки или НК-клетки для экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или несколько конструкций CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы изготовления, раскрытые в данном документе, применяют для изготовления клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую два CAR, раскрытые в данном документе (например, tandemный и/или двойной CAR для CD19/CD22, раскрытый в данном документе). В некоторых вариантах осуществления способы изготовления, раскрытые в данном документе, применяют для изготовления клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR диатела, раскрытый в данном документе, например, CAR диатела к CD22/CD19, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы изготовления, раскрытые в данном документе, применяют для изготовления клетки, содержащей две молекулы нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует CAR, раскрытый в данном документе (например, одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR к CD22, и одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR к CD19). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрена популяция клеток (например, иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или НК-клеток), полученных в любом из производственных процессов, описанных в данном документе.

#### Процесс активации

В некоторых вариантах осуществления с помощью способов, раскрытых в данном документе, можно изготавливать иммунные эффекторные клетки, сконструированные для экспрессии одного или нескольких CAR за менее чем 24 часа. Не ограничиваясь теорией, способы, предусмотренные в данном документе, обеспечивают сохранение недифференцированного фенотипа Т-клеток, таких как наивные Т-клетки, во время производственного процесса. Такие клетки, экспрессирующие CAR, с

недифференцированным фенотипом могут персистировать дольше и/или размножаться лучше *in vivo* после инфузии. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетки, полученные с помощью способов изготовления, предусмотренных в данном документе, содержат более высокую процентную долю стволовых Т-клеток памяти по сравнению с CAR-T-клетками, полученными с помощью традиционного производственного процесса, например, как измерено с применением секвенирования РНК одиночных клеток или совокупности клеток или проточной цитометрии с применением маркеров, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетки, полученные с помощью способов изготовления, предусмотренных в данном документе, содержат более низкую процентную долю эффекторных Т-клеток по сравнению с CAR-T-клетками, полученными с помощью традиционного производственного процесса, например, как измерено с применением секвенирования РНК одиночных клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетки, полученные с помощью способов изготовления, предусмотренных в данном документе, обеспечивают лучшее сохранение свойств стволовых клеток у Т-клеток по сравнению с CAR-T-клетками, полученными с помощью традиционного производственного процесса, например, как измерено с применением секвенирования РНК одиночных клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетки, полученные с помощью способов изготовления, предусмотренных в данном документе, демонстрируют более низкий уровень гипоксии по сравнению с CAR-T-клетками, полученными с помощью традиционного производственного процесса, например, как измерено с применением секвенирования РНК одиночных клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетки, полученные с помощью способов изготовления, предусмотренных в данном документе, демонстрируют более низкий уровень аутофагии по сравнению с CAR-T-клетками, полученными с помощью традиционного производственного процесса, например, как измерено с применением секвенирования РНК одиночных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сконструированы, чтобы содержать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тандемный или двойной CAR, раскрытый в данном документе (например, тандемный или двойной CAR для CD19/CD22, раскрытый в данном документе). В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сконструированы, чтобы содержать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тандемный или двойной CAR, раскрытый в данном документе, например, тандемный или двойной CAR для CD22/CD19, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сконструированы, чтобы содержать две молекулы нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует CAR, раскрытый в данном документе (например, одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR для CD22, и одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR для CD19). В других вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сконструированы, чтобы содержать одну молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует один или два CAR, раскрытые в данном документе (например, одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую

тандемный CAR для CD22/CD19 или CAR для CD22/CD19).

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, не предусматривают применение гранулы, такой как Dynabeads<sup>®</sup> (например, Dynabeads<sup>®</sup> для CD3/CD28), и не предусматривают стадию удаления гранул. В некоторых вариантах осуществления CAR-T-клетки, изготовленные с помощью способов, раскрытых в данном документе, можно вводить субъекту с применением минимального размножения *ex vivo*, например, менее 2 дней, менее 1 дня, менее 12 часов, менее 8 часов, менее 6 часов, менее 4 часов, менее 3 часов, менее 2 часов, менее 1 часа или без размножения *ex vivo*. Соответственно, способы, описанные в данном документе, предусматривают быстрый производственный процесс для получения улучшенных продуктов на основе клеток, экспрессирующих CAR, для применения в лечении заболевания у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены способы получения популяции клеток (например, T-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR) (например, один или несколько CAR, например, два CAR), включающие: (i) приведение популяции клеток (например, T-клеток, например, T-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта, полученного в результате лейкофереза) в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток; (ii) приведение популяции клеток (например, T-клеток) в контакт с молекулой(-ами) нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей(-ими) CAR, за счет чего получают популяцию клеток (например, T-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и (iii) сбор популяции клеток (например, T-клеток) для хранения (например, повторное составление популяции клеток в среде для криоконсервирования) или введения, где (a) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и стадию (iii) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 22, 23 или 24 часа после начала стадии (i), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (i); (b) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и стадию (iii) проводят не позже чем через 30 часов после начала стадии (ii), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 часов после начала стадии (ii); или (c) популяцию клеток из стадии (iii) не размножают или размножают до увеличения количества клеток на не более чем 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40%, например, не более чем 10%, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i); или d) популяция из стадии (iii) является меньшей или меньше на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, или 70%, например, согласно оценке по числу живых клеток по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i). В некоторых вариантах

осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в вирусном векторе, например, вирусном векторе, выбранном из лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в невирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в плазмиде. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) не находится в каком-либо векторе. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает трансдукцию популяции клеток (например, Т-клеток) вирусным(-ыми) вектором(-ами), содержащим(-ими) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов способы дополнительно включают добавление вспомогательного вещества или реагента, усиливающего трансдукцию, в среду для культивирования клеток, чтобы увеличить эффективность трансдукции. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество или реагент, усиливающий трансдукцию, содержит катионный полимер. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество или реагент, усиливающий трансдукцию, выбраны из LentiBOOST™ (Sirion Biotech), вектофусина-1, F108 (полоксамер 338 или Pluronic® F-38), гексадиметринбромид (полибрена), PEA, Pluronic F68, Pluronic F127, протаминсульфата, Synperonic или LentiTrans™. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество представляет собой LentiBOOST™ (Sirion Biotech). В других вариантах осуществления вспомогательное вещество представляет собой F108 (полоксамер 338 или Pluronic® F-38).

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток (например, Т-клеток) собирают из образца, полученного путем афереза (например, образца, полученного путем лейкоафереза) у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкоафереза), собирают у субъекта и доставляют в виде замороженного образца (например, криоконсервированного образца) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Затем замороженный образец, полученный путем афереза, размораживают и из образца, полученного путем афереза, отбирают Т-клетки (например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки), например, с применением установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS® Prodigy®). Затем отобранные Т-клетки (например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки) высевают для изготовления CART с применением процесса активации, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления отобранные Т-клетки (например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки и/или CD8<sup>+</sup> Т-клетки) подвергают одному или нескольким циклам замораживания-размораживания перед посевом для изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза



(например, образец, полученный путем лейкофереза), собирают у субъекта и доставляют в виде свежего продукта (например, продукта, который не замораживают) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Отбирают Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) из образца, полученного путем афереза, например, с применением установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>). Затем отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) высевают для изготовления CART с применением процесса активации, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) подвергают одному или нескольким циклам замораживания-размораживания перед посевом для изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкофереза), собирают у субъекта. Отбирают Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) из образца, полученного путем афереза, например, с применением установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>). Затем отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) доставляют в виде замороженного образца (например, криоконсервированного образца) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Затем отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) размораживают и высевают для изготовления CART с применением процесса активации, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления клетки (например, Т-клетки) приводят в контакт с антителами к CD3 и антителами к CD28 и, например, после этого немедленно осуществляют трансдукцию с помощью вектора (например, лентивирусного вектора) (например, одного или нескольких векторов), кодирующего CAR (например, один или несколько CAR). Через 24 часа после начала культивирования клетки промывают и составляют для хранения или введения.

Не ограничиваясь теорией, короткая стимуляция CD3 и CD28 может способствовать эффективной трансдукции самообновляющихся Т-клеток. По сравнению с традиционными подходами к изготовлению CART процесс активации, предусмотренный в данном документе, не предусматривает продолжительного размножения *ex vivo*. Подобно процессу с использованием цитокина, процесс активации, предусмотренный в данном документе, также обеспечивает сохранение недифференцированных Т-клеток во время изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления клетки (например, Т-клетки) приводят в контакт с антителами к CD3 и антителами к CD28 в течение, например, 12 часов с последующей трансдукцией с помощью вектора (например, лентивирусного вектора) (например, одного или нескольких векторов), кодирующего CAR (например, один или несколько CAR). Через 24 часа после начала культивирования клетки промывают и составляют для хранения или введения.

Не ограничиваясь теорией, короткая стимуляция CD3 и CD28 может

способствовать эффективной трансдукции самообновляющихся Т-клеток. По сравнению с традиционными подходами к изготовлению CART процесс активации, предусмотренный в данном документе, не предусматривает продолжительного размножения *ex vivo*. Подобно процессу с использованием цитокина, процесс активации, предусмотренный в данном документе, также обеспечивает сохранение недифференцированных Т-клеток во время изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отбирают с применением гранул с антителом к CD4 и антителом к CD8 путем положительного отбора, с применением, например, установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отбирают с применением гранул с антителом к CD45RA и антителом к CCR7 путем положительного отбора с применением, например, установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отбирают с применением гранул с антителом к CD45RA и антителом к CD27 путем положительного отбора с применением, например, установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отбирают с применением гранул с антителом к CD3 и антителом к CD28 путем положительного отбора с применением, например, установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отбирают с применением гранул с антителами к линии дифференцировки (за исключением Т-клеток) путем отрицательного отбора с применением, например, установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>).

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой средство, которое стимулирует CD3. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу, представляет собой средство, которое стимулирует CD28, ICOS, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD226 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу, представляет собой средство, которое стимулирует CD28. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, выбрано из антитела (например, однодоменного антитела (например, антитела на основе переменного домена тяжелой цепи), пептида, Fab-фрагмента или scFv), низкомолекулярного соединения или лиганда (например, существующего в природе, рекомбинантного или химерного лиганда). В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой антитело к CD3. В некоторых вариантах осуществления средство,

которое стимулирует костимулирующую молекулу, выбрано из антитела (например, однодоменного антитела (например, антитела на основе вариабельного домена тяжелой цепи), пептитела, Fab-фрагмента или scFv), низкомолекулярного соединения или лиганда (например, существующего в природе, рекомбинантного или химерного лиганда). В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу, представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу, представляет собой антитело к CD28. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу, не содержит гранулу. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, содержит антитело к CD3, ковалентно присоединенное к коллоидной полимерной наноматрице. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу, содержит антитело к CD28, ковалентно присоединенное к коллоидной полимерной наноматрице. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу, содержат средство для Т-клеток TransAct™.

В некоторых вариантах осуществления матрица содержит полимерный, например, биоразлагаемый или биосовместимый, инертный материал, например, который является нетоксичным для клеток, или состоит из такого материала. В некоторых вариантах осуществления матрица состоит из гидрофильных полимерных цепей, которые обладают максимальной подвижностью в водном растворе благодаря гидратации цепей. В некоторых вариантах осуществления подвижная матрица может состоять из коллагена, очищенных белков, очищенных пептидов, полисахаридов, гликозаминогликанов или композиций на основе внеклеточного матрикса. Полисахарид может включать, например, простые эфиры целлюлозы, крахмал, гуммиарабик, агарозу, декстран, хитозан, гиалуроновую кислоту, пектины, ксантан, гуаровую камедь или альгинат. Другие полимеры могут включать сложные полиэфиры, простые полиэфиры, полиакрилаты, полиакриламиды, полиамины, полиэтиленимины, полимеры поликватерниума, полифосфазены, поливинилспирты, поливинилацетаты, поливинилпирролидоны, блок-сополимеры или полиуретаны. В некоторых вариантах осуществления подвижная матрица представляет собой полимер декстрана.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты), кодирующей CAR (например, один или несколько CAR). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток трансдуцируют молекулой ДНК (например, одной или несколькими молекулами ДНК), кодирующей CAR (например, один или несколько CAR).

В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой(-ами) нуклеиновой кислоты, кодирующей(-ими) CAR, происходит одновременно с приведением популяции клеток в контакт со средством, которое









клеток на не более чем 15%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 20%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 25%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 30%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 35%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 40%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток, обеспечиваемого за не более чем 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 36 или 48 часов, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления процесс активации осуществляют в бессывороточной среде для клеток. В некоторых вариантах осуществления процесс активации осуществляют в среде для клеток, содержащей один или несколько цитокинов, выбранных из IL-2, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления hetIL-15 содержит аминокислотную последовательность

под



NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH  
 DTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSITCPPPMS  
 VEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVANHWTTPSLKCIRDP  
 ALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSP  
 STGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQG (SEQ ID NO: 109). В  
 некоторых вариантах осуществления hetIL-15 содержит аминокислотную  
 последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70, 75, 80, 85,  
 90, 95 или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах осуществления  
 процесс активации осуществляют в среде для клеток, содержащей ингибитор LSD1. В  
 некоторых вариантах осуществления процесс активации осуществляют в среде для  
 клеток, содержащей ингибитор MALT1. В некоторых вариантах осуществления  
 бессывороточная среда для клеток содержит заменитель сыворотки крови. В некоторых  
 вариантах осуществления заменитель сыворотки крови представляет собой заменитель  
 сыворотки крови для иммунных клеток (ICSR) CTS™ В некоторых вариантах  
 осуществления уровень ICSR может составлять, например, не более 5%, например,  
 приблизительно 1%, 2%, 3%, 4% или 5%. Не ограничиваясь теорией, применение среды  
 для клеток, например, среды для быстрого изготовления, содержащей ICSR, например, 2%  
 ICSR, может повышать жизнеспособность клеток во время производственного процесса,  
 описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены  
 способы получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют  
 химерный антигенный рецептор (CAR), включающие: (a) обеспечение образца,  
 полученного путем афереза (например, свежего или криоконсервированного образца,  
 полученного путем лейкофереза), собранного у субъекта; (b) отбор Т-клеток из образца,  
 полученного путем афереза (например, с применением отрицательного отбора,  
 положительного отбора или отбора без гранул); (c) высевание выделенных Т-клеток в  
 концентрации, например, от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  клеток/мл; (d) приведение Т-клеток в контакт  
 со средством, которое стимулирует Т-клетки, например, средством, которое стимулирует  
 комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу  
 на поверхности клеток (например, приведение Т-клеток в контакт с антителами к CD3  
 и/или антителами к CD28, например, приведение Т-клеток в контакт с TransAct); (e)  
 приведение Т-клеток в контакт с молекулой(-ами) нуклеиновой кислоты (например,  
 молекулой ДНК или РНК), кодирующей(-ими) CAR (например, приведение Т-клеток в  
 контакт с вирусом, содержащим молекулу(-ы) нуклеиновой кислоты, кодирующую(-ие)  
 CAR), в течение, например, 6-48 часов, например, 20-28 часов; и (f) промывание и сбор Т-  
 клеток для хранения (например, повторное составление Т-клеток в среде для  
 криоконсервирования) или введения. В некоторых вариантах осуществления стадию (f)  
 проводят не позже чем через 30 часов после начала стадии (d) или (e), например, не позже  
 чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 часов после начала стадии (d) или (e).

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрена

популяция клеток (например, иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или НК-клеток), полученных с помощью любого из производственных процессов, описанных в данном документе (например, процесса активации, описанного в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления процентная доля наивных клеток, например, наивных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток в конце производственного процесса (например, в конце процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе) (1) является такой же, (2) отличается, например, на не более чем 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15%, или (3) является повышенной, например, на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% или 25%, по сравнению с процентной долей наивных клеток, например, наивных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ клеток, в популяции клеток в начале производственного процесса (например, в начале процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток в конце производственного процесса (например, в конце процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе) демонстрирует более высокую процентную долю наивных клеток, например, наивных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток (например, выше на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50%), по сравнению с клетками, полученными способом, который длится, например, более 26 часов (например, который длится более 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней) или который предусматривает размножение популяции клеток *in vitro* в течение, например, более 3 дней (например, размножение популяции клеток *in vitro* в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней), в остальном аналогичным данному способу.

В некоторых вариантах осуществления процентная доля наивных клеток, например, наивных Т-клеток, например, CD45RA+ CD45RO- CCR7+ Т-клеток, в популяции клеток в конце производственного процесса (например, в конце процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе) составляет не менее 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%.

В некоторых вариантах осуществления процентная доля клеток центральной памяти, например, Т-клеток центральной памяти, например, CD95+ Т-клеток центральной памяти, CD45RO+ Т-клеток центральной памяти и/или CCR7+ Т-клеток центральной памяти, в популяции клеток в конце производственного процесса (например, в конце процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе) (1) является такой же, (2) отличается, например, на не более чем 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15%, или (3) является сниженной, например, на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% или 25%, по сравнению с процентной долей клеток центральной памяти, например, Т-клеток центральной памяти, например, CD95+ Т-клеток

центральной памяти, в популяции клеток в начале производственного процесса (например, в начале процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток в конце производственного процесса (например, в конце процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе) демонстрирует более низкую процентную долю клеток центральной памяти, например, Т-клеток центральной памяти, например, CD95+ Т-клеток центральной памяти (например, ниже на по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50%), по сравнению с клетками, полученными способом, который длится, например, более 26 часов (например, который длится более 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней) или который предусматривает размножение популяции клеток *in vitro* в течение, например, более 3 дней (например, размножение популяции клеток *in vitro* в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней), в остальном аналогичным данному способу.

В некоторых вариантах осуществления процентная доля клеток центральной памяти, например, Т-клеток центральной памяти, например, CD95+ Т-клеток центральной памяти, в популяции клеток в конце производственного процесса (например, в конце процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе) составляет не более 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80%.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток в конце производственного процесса (например, в конце процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе) после введения *in vivo* персистирует дольше или размножается на более высоком уровне (например, выше на по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90%) по сравнению с клетками, полученными способом, который длится, например, более 26 часов (например, который длится более 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней) или который предусматривает размножение популяции клеток *in vitro* в течение, например, более 3 дней (например, размножение популяции клеток *in vitro* в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней), в остальном аналогичным данному способу.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток была обогащена клетками, экспрессирующими IL6R (например, клетками, которые являются положительными по IL6R $\alpha$  и/или IL6R $\beta$ ), до начала производственного процесса (например, до начала процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит, например, не менее 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% клеток, экспрессирующих IL6R (например, клеток, которые являются положительными по IL6R $\alpha$  и/или IL6R $\beta$ ), в начале производственного процесса (например, в начале процесса с использованием цитокина или процесса активации, описанных в данном документе).

Процесс с использованием цитокина

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены

способы получения популяции клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR) (например, один или несколько CAR, например, два CAR), включающие: (1) приведение популяции клеток в контакт с цитокином, выбранным из IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-6 или их комбинации, (2) приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой(-ами) нуклеиновой кислоты (например, молекулой ДНК или РНК), кодирующей(-ими) CAR, за счет чего получают популяцию клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и (3) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторное составление популяции клеток в среде для криоконсервирования) или введения, где: (а) стадию (2) проводят вместе со стадией (1) или не позже чем через 5 часов после начала стадии (1), например, не позже чем через 1, 2, 3, 4 или 5 часов после начала стадии (1), и стадию (3) проводят не позже чем через 26 часов после начала стадии (1), например, не позже чем через 22, 23 или 24 часа после начала стадии (1), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (1), или (b) популяцию клеток из стадии (3) не размножают или размножают до увеличения количества клеток на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например, не более чем 10%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (1). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в вирусном векторе, например, вирусном векторе, выбранном из лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в невирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) находится в плазмиде. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты на стадии (2) не находится в каком-либо векторе. В некоторых вариантах осуществления стадия (2) включает трансдуцирование популяции клеток (например, Т-клеток) вирусным вектором, содержащим молекулу(-ы) нуклеиновой кислоты, кодирующую(-ие) CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы, чтобы содержать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тандемный или двойной CAR, раскрытый в данном документе (например, тандемный или двойной CAR для CD19/CD22, раскрытый в данном документе). В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы, чтобы содержать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR диатела, раскрытый в данном документе, например, CAR диатела к CD22/CD19, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы, чтобы содержать две молекулы нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует CAR, раскрытый в данном документе (например, одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR для CD22, и одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR для CD19).

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток (например, Т-клеток) собирают из образца, полученного путем афереза (например, образца, полученного путем лейкофереза) у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкофереза), собирают у субъекта и доставляют в виде замороженного образца (например, криоконсервированного образца) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Затем замороженный образец, полученный путем афереза, размораживают и отбирают Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) из образца, полученного путем афереза, например, с применением установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>). Затем отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) высевают для изготовления CART с применением процесса с использованием цитокина, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в конце процесса с использованием цитокина CAR-Т-клетки криоконсервируют и затем размораживают и вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) подвергают одному или нескольким циклам замораживания-размораживания перед посевом для изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкофереза), собирают у субъекта и доставляют в виде свежего продукта (например, продукта, который не замораживают) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Отбирают Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) из образца, полученного путем афереза, например, с применением установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>). Затем отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) высевают для изготовления CART с применением процесса с использованием цитокина, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) подвергают одному или нескольким циклам замораживания-размораживания перед посевом для изготовления CART.

В некоторых вариантах осуществления образец, полученный путем афереза (например, образец, полученный путем лейкофереза), собирают у субъекта. Отбирают Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) из образца, полученного путем афереза, например, с применением установки для сортировки клеток (например, устройства CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>). Затем отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) доставляют в виде замороженного образца (например, криоконсервированного образца) в учреждение, осуществляющее изготовление клеток. Затем отобранные Т-клетки (например, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки) размораживают и высевают для изготовления CART с применением процесса с использованием цитокина, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления после того, как клетки (например, Т-клетки) высевают, к клеткам добавляют один или несколько цитокинов (например, один

или несколько цитокинов, выбранных из IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-21 или IL-6 (например, IL-6/sIL-6R)), а также вектор (например, лентивирусный вектор) (например, один или несколько векторов), кодирующий CAR (например, один или несколько CAR). После инкубации в течение 20-24 часов клетки промывают и составляют для хранения или введения.

В отличие от традиционных подходов к изготовлению CART, процесс с использованием цитокина, предусмотренный в данном документе, не предусматривает стимуляцию CD3 и/или CD28 или размножение Т-клеток *ex vivo*. Т-клетки, которые приводятся в контакт с антителами к CD3 и антителами к CD28 и которые интенсивно размножают *ex vivo*, склонны демонстрировать дифференцировку в направлении фенотипа клеток центральной памяти. Не ограничиваясь теорией, процесс с использованием цитокина, предусмотренный в данном документе, обеспечивает сохранение или повышение количества Т-клеток с недифференцированным фенотипом во время изготовления CART, обеспечивая получение продукта на основе CART, который может дольше персистировать после инфузии субъекту.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с одним или несколькими цитокинами (например, одним или несколькими цитокинами, выбранными из IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), IL-21 или IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra)).

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2 и IL-7. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2 и IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-2 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7 и IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-21 и IL-6 (например, IL-6/sIL-6Ra). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и

IL-21. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток дополнительно приводят в контакт с ингибитором LSD1. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток дополнительно приводят в контакт с ингибитором MALT1.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 ед./мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нг/мл IL-7. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нг/мл IL-15.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты), кодирующей CAR (например, один или несколько CAR). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток трансдуцируют молекулой ДНК (например, одной или несколькими молекулами ДНК), кодирующей CAR (например, один или несколько CAR).

В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит одновременно с приведением популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 часов после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 5 часов после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 4 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 3 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 2 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления приведение популяции клеток в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, происходит не позже чем через 1 час после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 72, 60, 48, 36, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 часов после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 26 часов после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 25 часов после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 24 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 23 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток собирают для хранения или введения не позже чем через 22 часа после начала приведения популяции клеток в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток не размножают *ex vivo*.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16%, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 5%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 10%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 15%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 20%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления



популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 25%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 30%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 35%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток на не более чем 40%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток размножают до увеличения количества клеток, обеспечиваемого за не более чем 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 36 или 48 часов, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток до ее приведения в контакт с одним или несколькими цитокинами, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток не приводят в контакт *in vitro* со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR (например, антителом к CD3), и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток (например, антителом к CD28), или, если приводят в контакт, стадия приведения в контакт составляет менее 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 часов.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток приводят в контакт *in vitro* со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR (например, антителом к CD3), и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток (например, антителом к CD28), в течение 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 часов.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, изготовленная с применением процесса с использованием цитокина, предусмотренного в данном документе, демонстрирует более высокую процентную долю наивных клеток среди клеток, экспрессирующих CAR (например, выше на по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%), по сравнению с клетками, полученными способом, который дополнительно включает, например, приведение популяции клеток в контакт со средством, которое связывает комплекс CD3/TCR (например, антителом к CD3), и/или средством, которое связывает костимулирующую молекулу на поверхности клеток (например, антителом к CD28), в остальном аналогичным данному способу.

В некоторых вариантах осуществления процесс с использованием цитокина,

предусмотренный в данном документе, осуществляют в среде для клеток, содержащей не более 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 или 8% сыворотки крови. В некоторых вариантах осуществления процесс с использованием цитокина, предусмотренный в данном документе, осуществляют в среде для клеток, содержащей ингибитор LSD1, ингибитор MALT1 или их комбинацию.

#### Дополнительные иллюстративные способы изготовления

В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, активируют, например, с применением Dynabeads<sup>®</sup>, покрытых антителом к CD3/CD28, приводят в контакт с одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR (например, один или несколько CAR), и затем размножают *in vitro* в течение, например, 7, 8, 9, 10 или 11 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, отбирают из свежего или криоконсервированного образца, полученного путем лейкофереза, например, с применением положительного или отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления клетки приводят в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (например, одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты), кодирующей CAR (например, один или несколько CAR). В некоторых вариантах осуществления клетки приводят в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей тандемный или двойной CAR, раскрытый в данном документе (например, тандемный или двойной CAR для CD19/CD22). В некоторых вариантах осуществления клетки приводят в контакт с двумя молекулами нуклеиновой кислоты, одной, экспрессирующей первый CAR (например, CAR для CD22), и другой, экспрессирующей второй CAR (например, CAR для CD19). В некоторых вариантах осуществления клетки приводят в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR диатела (например, CAR диатела к CD22/CD19, раскрытый в данном документе).

#### Элютриация

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают способ элютриации, с помощью которого удаляют нежелательные клетки, например, моноциты и бластные клетки, что в результате приводит к улучшенному обогащению требуемыми иммунными эффекторными клетками, подходящими для экспрессии CAR. В одном варианте осуществления способ элютриации, описанный в данном документе, оптимизирован для обогащения требуемыми иммунными эффекторными клетками, подходящими для экспрессии CAR, из ранее замороженного образца, например, размороженного образца. В некоторых вариантах осуществления способ элютриации, описанный в данном документе, обеспечивает получение клеток с повышенной чистотой по сравнению с получением клеток, собранных по результатам протоколов элютриации, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления способ элютриации, описанный в данном документе, включает использование оптимизированной вязкости исходного образца, например, образца клеток, например, размороженного клеточного образца, за счет разбавления определенными

изотоническими растворами (например, PBS), а также использование оптимизированной комбинации скоростей потока и объема собираемого материала для каждой фракции, собираемой с помощью устройства для элютриации. Иллюстративные способы элютриации, которые можно было бы применять в настоящем изобретении, описаны на страницах 48-51 из WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### Центрифугирование в градиенте плотности

Изготовление терапевтического продукта на основе адоптивной клетки требует обработки требуемых клеток, например, иммунных эффекторных клеток, отдельно от сложной смеси клеток крови и элементов крови, присутствующих в исходных материалах периферической крови, полученных путем афереза. Образцы лимфоцитов периферической крови были успешно выделены с помощью центрифугирования в градиенте плотности с использованием раствора Ficoll. Однако Ficoll не является предпочтительным реагентом для выделения клеток для терапевтического применения, поскольку Ficoll не соответствует критериям для клинического применения. Кроме того, Ficoll содержит гликоль, который потенциально токсичен для клеток. Кроме того, при центрифугировании в градиенте плотности Ficoll размороженных продуктов, полученных путем афереза, после криоконсервации получают неоптимальный продукт на основе Т-клеток, например, как описано в примерах в данном документе. Например, в препаратах на основе клеток, выделенных посредством центрифугирования в градиенте плотности с использованием раствора Ficoll, наблюдали потерю Т-клеток в конечном продукте при относительном увеличении количества клеток, отличных от Т-клеток, особенно нежелательных В-клеток, бластных клеток и моноцитов.

Не ограничиваясь теорией, полагают, что иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, обезвоживаются во время криоконсервации, становясь более плотными, чем свежие клетки. Не ограничиваясь теорией, также полагают, что иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, остаются более плотными дольше, чем другие клетки крови, и, таким образом, легче теряются при разделении в градиенте плотности Ficoll по сравнению с другими клетками. Соответственно, не ограничиваясь теорией, полагают, что среда с плотностью, превышающей плотность Ficoll, будет обеспечивать улучшенное выделение требуемых иммунных эффекторных клеток по сравнению с Ficoll или другими средами с такой же плотностью, как у Ficoll, например, 1,077 г/мл.

В некоторых вариантах осуществления способ центрифугирования в градиенте плотности, описанный в данном документе, включает применение среды с градиентом плотности, содержащей йодиксанол. В некоторых вариантах осуществления среда с градиентом плотности содержит приблизительно 60% йодиксанола в воде.

В некоторых вариантах осуществления способ центрифугирования в градиенте плотности, описанный в данном документе, включает применение среды с градиентом плотности, характеризующейся плотностью, превышающей плотность Ficoll. В некоторых вариантах осуществления способ центрифугирования в градиенте плотности, описанный в

данном документе, включает применение среды с градиентом плотности, характеризующейся плотностью, составляющей более 1,077 г/мл, например, более 1,077 г/мл, более 1,1 г/мл, более 1,15 г/мл, более 1,2 г/мл, более 1,25 г/мл, более 1,3 г/мл, более 1,31 г/мл. В некоторых вариантах осуществления среда с градиентом плотности характеризуется плотностью, составляющей приблизительно 1,32 г/мл.

Дополнительные варианты осуществления центрифугирования в градиенте плотности описаны на страницах 51-53 из WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### Обогащение посредством отбора

В данном документе предусмотрены способы отбора конкретных клеток для улучшения обогащения требуемыми иммунными эффекторными клетками, подходящими для экспрессии CAR. В некоторых вариантах осуществления отбор включает положительный отбор, например, отбор требуемых иммунных эффекторных клеток. В некоторых вариантах осуществления отбор включает отрицательный отбор, например, отбор нежелательных клеток, например, удаление нежелательных клеток. В вариантах осуществления способы положительного или отрицательного отбора, описанные в данном документе, проводят в условиях потока, например, с помощью проточного устройства, например, проточного устройства, описанного в данном документе. Иллюстративные способы положительного и отрицательного отбора описаны на страницах 53-57 из WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Способы отбора можно осуществлять в условиях потока, например, с помощью проточного устройства, также называемого системой для обработки клеток, для дополнительного обогащения препарата клеток требуемыми иммунными эффекторными клетками, например, Т-клетками, подходящими для экспрессии CAR. Иллюстративные проточные устройства описаны на страницах 57-70 из WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные способы разделения клеток и удаления гранул описаны на страницах 70-78 из WO 2017/117112, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Процедуры отбора не ограничиваются теми, которые описаны на страницах 57-70 из WO 2017/117112. Можно применять отрицательный отбор Т-клеток путем удаления нежелательных клеток с помощью гранул с антителами к CD19, CD14 и CD26 от Miltenyi в комбинации с колоночной технологией (CliniMACS<sup>®</sup> Plus или CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>) или положительный отбор Т-клеток с помощью комбинации гранул с антителами к CD4 и CD8 от Miltenyi и колоночной технологии (CliniMACS<sup>®</sup> Plus или CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup>). В качестве альтернативы можно применять технологию без использования колонки с гранулами с антителами к CD3 с возможностью последующего удаления (GE Healthcare).

Кроме того, можно также применять технологии без использования гранул, такие как устройства ThermoGenesis X-series.

Способы получения клетки, раскрытой в данном документе, включают таковые, известные из уровня техники, например, описанные в CN 108103105, CN 108085342, CN

108018312, CN 107287164, WO 18052947, WO 17123956, WO 17114497, WO 17103596, WO 17068421, WO 17023803, WO 17015427, WO 16196388, WO 16168595, WO 14186469, WO 17165245, WO 18106732, WO 17015490, WO 18075813, WO 18102761, WO 17127755, WO 17214333, WO 18059549, WO 17190100, WO 16180778, WO 18057823 и/или CN 106957822, каждая из которых настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте.

#### Источники клеток

Перед осуществлением размножения и генетической модификации или другой модификации источник клеток, например Т-клеток или естественных киллерных клеток (НК), можно получать от субъекта. Предполагается, что термин "субъект" включает живые организмы, у которых можно вызвать иммунный ответ (например, млекопитающих). Примеры субъектов включают людей, обезьян, шимпанзе, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные формы. Т-клетки можно получить из ряда источников, в том числе из мононуклеарных клеток периферической крови, костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из очага инфекции, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. В определенных аспектах настоящего изобретения иммунные эффекторские клетки, например Т-клетки, можно получить из дозы крови, собранной у субъекта, с применением любой из ряда методик, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение с помощью Ficoll™. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивидуума получают путем афереза. Продукт, полученный путем афереза, как правило, содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном аспекте клетки, собранные путем афереза, можно промыть, чтобы удалить фракцию плазмы крови и необязательно поместить клетки в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В одном аспекте настоящего изобретения клетки промывают фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). В альтернативном аспекте в промывочном растворе отсутствует кальций и может отсутствовать магний или могут отсутствовать многие, если не все, двухвалентные катионы. Начальные стадии активации в отсутствие кальция могут привести к усиленной активации. Для специалистов средней квалификации в данной области техники будет очевидно, что стадию промывки можно осуществлять с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, как например, с применением полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывки клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащий Ca и не содержащий Mg, PlasmaLyte A или другой солевой раствор с буфером или без него. В качестве альтернативы нежелательные компоненты из образца, полученного путем афереза, можно удалить и клетки можно непосредственно ресуспендировать в питательной среде.

В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем

лизиса эритроцитов и истощения популяции моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или посредством элютриации с противоточным центрифугированием.

Способы, описанные в данном документе, могут включать, например, отбор конкретной субпопуляции иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которая представляет собой популяцию, истощенную по регуляторным Т-клеткам с истощением по CD25+ клеткам, с применением, например, методики отрицательного отбора, например, описанной в данном документе. Популяция, истощенная по регуляторным Т-клеткам, предпочтительно содержит менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% CD25+ клеток.

В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, удаляют из популяции с применением антитела к CD25 или его фрагмента или CD25-связывающего лиганда IL-2. В одном варианте осуществления антитело к CD25 или его фрагмент или CD25-связывающий лиганд конъюгированы с субстратом, например гранулой, или иным образом покрывают субстрат, например, гранулу. В одном варианте осуществления антитело к CD25 или его фрагмент конъюгированы с субстратом, описанным в данном документе.

В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, удаляют из популяции с применением реагента для истощения по CD25 от Miltenyi™. В одном варианте осуществления соотношение клеток и реагента для истощения по CD25 составляет  $1e7$  клеток на 20 мкл, или  $1e7$  клеток на 15 мкл, или  $1e7$  клеток на 10 мкл, или  $1e7$  клеток на 5 мкл, или  $1e7$  клеток на 2,5 мкл, или  $1e7$  клеток на 1,25 мкл.

В одном варианте осуществления популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащая истощению, содержит приблизительно  $6 \times 10^9$  CD25+ Т-клеток. В других аспектах популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащая истощению, содержит от приблизительно  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{10}$  CD25+ Т-клеток с включением любого целочисленного значения в этом промежутке. В одном варианте осуществления полученная популяция, истощенная по регуляторным Т-клеткам, содержит  $2 \times 10^9$  регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток, или меньше (например,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$  или меньше CD25+ клеток).

В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ клетки, удаляют из популяции с помощью системы CliniMACS с набором трубок для истощения, таким как, например, трубки 162-01. В одном варианте осуществления система CliniMACS работает с установленными параметрами истощения, например, такими как DEPLETION2.1.

Способы, описанные в данном документе, могут включать более одной стадии отбора, например, более одной стадии истощения. Обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора можно осуществлять, например, с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для клеток, подвергаемых

отрицательному отбору. Одним из способов является сортировка и/или отбор клеток с помощью отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которой используется коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, подвергаемых отрицательному отбору. Например, для обогащения клетками CD4<sup>+</sup> путем отрицательного отбора смесь моноклональных антител может включать антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8.

Также представлены способы, которые включают удаление из популяции клеток, экспрессирующих ингибитор контрольной точки иммунного ответа, например, ингибитор контрольной точки иммунного ответа, описанный в данном документе, например, одной или нескольких из PD1<sup>+</sup> клеток, LAG3<sup>+</sup> клеток и TIM3<sup>+</sup> клеток, за счет чего получают популяцию, истощенную по регуляторным Т-клеткам, например, истощенную по CD25<sup>+</sup> клеткам и истощенную по клеткам с ингибитором контрольной точки иммунного ответа, например, истощенной по PD1<sup>+</sup>, LAG3<sup>+</sup> и/или TIM3<sup>+</sup> клеткам. Иллюстративные ингибиторы контрольных точек иммунного ответа включают B7-H1, B&-1, CD160, P1H, 2B4, PD1, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, TIGIT, CTLA-4, BTLA и LAIR1. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие ингибитор контрольных точек иммунного ответа, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25<sup>+</sup> клетками. Например, антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к ингибитору контрольных точек иммунного ответа или его фрагмент могут быть присоединены к одной и той же грануле, которую можно применять для удаления клеток, или антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к ингибитору контрольных точек иммунного ответа или его фрагмент могут быть присоединены к отдельным гранулам, смесь которых можно применять для удаления клеток. В некоторых вариантах осуществления удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25<sup>+</sup> клеток, и удаление клеток, экспрессирующих ингибитор контрольных точек иммунного ответа, является последовательным и может происходить, например, в любом порядке.

Способы, описанные в данном документе, могут включать стадию положительного отбора. Например, Т-клетки могут быть выделены путем инкубирования с гранулами, конъюгированными с антителами к CD3/CD28 (например, 3×28), такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора требуемых Т-клеток. В одном аспекте период времени составляет приблизительно 30 минут. В дополнительном аспекте период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или больше и включает все целочисленные значения в этом промежутке. В дополнительном аспекте период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В еще одном предпочтительном аспекте период времени составляет от 10 до 24 часов. В одном аспекте период времени инкубирования составляет 24 часа. Более длительное время инкубирования можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, в которой Т-клеток немного по сравнению с другими типами

клеток, как, например, при выделении лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), из опухолевой ткани или у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, при использовании более длительного времени инкубирования может увеличиваться эффективность захвата CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Таким образом, просто сокращая или удлиняя время, в течение которого Т-клетки имеют возможность связываться с гранулами CD3/CD28, и/или увеличивая или уменьшая соотношение гранул и Т-клеток (как описано дополнительно в данном документе), можно производить предпочтительный положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие моменты времени в ходе процесса. Кроме того, путем увеличения или уменьшения соотношения антител к CD3 и/или антител к CD28 на гранулах или другой поверхности можно осуществлять предпочтительный положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие требуемые моменты времени.

В одном варианте осуществления можно отбирать популяцию Т-клеток, которая экспрессирует одно или несколько из IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима В и перфорина или других подходящих молекул, например, других цитокинов. Способы скрининга в отношении клеточной экспрессии можно определить, например, с помощью способов, описанных в публикации согласно РСТ № WO 2013/126712.

Для выделения требуемой популяции клеток путем положительного или отрицательного отбора можно изменять концентрацию клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы). В определенных аспектах может потребоваться значительно уменьшить объем, в котором гранулы и клетки смешиваются друг с другом (например, увеличить концентрацию клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и гранул. Например, в одном аспекте используют концентрацию, составляющую приблизительно 10 миллиардов клеток/мл, 9 миллиардов клеток/мл, 8 миллиардов клеток/мл, 7 миллиардов клеток/мл, 6 миллиардов клеток/мл или 5 миллиардов клеток/мл. В одном аспекте используют концентрацию, составляющую 1 миллиард клеток/мл. В одном аспекте используют концентрацию клеток, составляющую от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных аспектах можно использовать концентрации, составляющие 125 или 150 миллионов клеток/мл.

Использование высоких концентраций может приводить к увеличению выхода клеток, активации клеток и размножения клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые могут характеризоваться слабой экспрессией целевых антигенов, представляющих интерес, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или клетки из образцов, в которых присутствует много опухолевых клеток (например, лейкозной крови, опухолевой ткани и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и может потребоваться их получение. Например, использование высокой концентрации клеток позволяет проводить более эффективный отбор CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые обычно характеризуются более слабой



экспрессией CD28.

В связанном аспекте может потребоваться использование более низких концентраций клеток. Путем значительного разбавления смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы), взаимодействие между частицами и клетками сводится к минимуму. При этом отбираются клетки, в высоких количествах экспрессирующие требуемые антигены, которые должны будут связываться с частицами. Например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют CD28 на более высоких уровнях и захватываются при разбавленных концентрациях более эффективно, чем CD8<sup>+</sup> Т-клетки. В одном аспекте используемая концентрация клеток составляет  $5 \times 10^6$ /мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять от приблизительно  $1 \times 10^5$ /мл до  $1 \times 10^6$ /мл с включением любого целочисленного значения в этом промежутке.

В других аспектах клетки можно инкубировать на ротаторе в течение различных промежутков времени с различными скоростями при 2-10°C или при комнатной температуре.

Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после стадии промывки. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, стадия замораживания и последующего размораживания обеспечивает получение более однородного продукта за счет удаления гранулоцитов и в некоторой степени моноцитов из популяции клеток. После стадии промывки, на которой удаляют плазму крови и тромбоциты, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Хотя многие замораживающие растворы и параметры для замораживания известны в данной области техники и будут применимыми в данном случае, один способ предусматривает применение PBS, содержащего 20% DMSO и 8% человеческого сывороточного альбумина, или питательной среды, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% человеческого сывороточного альбумина и 7,5% DMSO или 31,25% PlasmaLyte-A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% человеческого сывороточного альбумина и 7,5% DMSO, или других подходящих сред для замораживания клеток, содержащих, например, Hespán и PlasmaLyte A, и затем клетки замораживают до -80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в паровой фазе жидкого азота в резервуаре для хранения. Можно применять другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемое замораживание немедленно при -20°C или в жидком азоте.

В определенных аспектах криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в данном документе, и оставляют на один час при комнатной температуре до активации с применением способов по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения также предусмотрен сбор образцов крови или продукта, полученного путем афереза у субъекта в период времени до того, как могут понадобиться размноженные клетки, описанные в данном документе. Ввиду этого, источник клеток, подлежащих размножению, можно собирать в любой момент времени, когда это необходимо, и требуемые клетки, такие как Т-клетки, можно выделять и замораживать для последующего применения в терапии на основе иммунных

эффекторных клеток для любых заболеваний или состояний, при которых будет наблюдаться благоприятный эффект терапии на основе иммунных эффекторных клеток, такой как описана в данном документе. В одном аспекте образец крови или образец, полученный путем афереза, отбирают у в целом здорового субъекта. В определенных аспектах образец крови или материал, получаемый путем афереза, отбирают у в целом здорового субъекта, который имеет риск развития заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для последующего применения. В определенных аспектах Т-клетки можно размножать, замораживать и использовать позднее. В определенных аспектах образцы собирают у пациента вскоре после постановки диагноза конкретного заболевания, описанного в данном документе, однако до проведения какого-либо лечения. В дополнительном аспекте клетки выделяют из образца крови или образца, полученного путем афереза, у субъекта до осуществления любого количества соответствующих способов лечения, в том числе без ограничения лечения такими средствами, как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапия, лучевая терапия, иммуносупрессивные средства, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолят и FK506, антитела или другие иммунодеструктивные средства, такие как САМРАТН, антитела к CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения Т-клетки получают от пациента непосредственно после лечения, при котором у субъекта остаются функциональные Т-клетки. В данном отношении наблюдалось, что после определенных видов лечения рака, в частности лечения лекарственными средствами, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты обычно восстанавливаются после лечения, качество полученных Т-клеток может быть оптимальным или улучшенным в отношении их способности размножаться *ex vivo*. Аналогично, после манипуляций *ex vivo* с использованием способов, описанных в данном документе, эти клетки могут находиться в состоянии, предпочтительном для усиленного приживания и размножения *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения рассматривается сбор клеток крови, в том числе Т-клеток, дендритных клеток или других клеток гемопоэтической линии дифференцировки, во время этой фазы восстановления. Кроме того, в определенных аспектах можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию с помощью GM-CSF) и схемы кондиционирования для создания у субъекта состояния, благоприятного для репопуляции, рециркуляции, регенерации и/или размножения определенных типов клеток, в частности, в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в данном документе, получают от субъекта, который получал низкую повышающую иммунитет

дозу ингибитора mTOR. В варианте осуществления популяцию иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, подлежащих конструированию для экспрессии CAR, собирают спустя достаточное время или после введения достаточной низкой повышающей иммунитет дозы ингибитора mTOR, чтобы уровень PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, или отношение PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, к PD1-положительным иммунным эффекторным клеткам, например, Т-клеткам или NK-клеткам, имеющимся у субъекта или собранным от субъекта, по меньшей мере временно были повышенными.

В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, которые были сконструированы или будут сконструированы для экспрессии CAR, может быть обработана *ex vivo* путем контакта с количеством ингибитора mTOR, которое повышает число PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, или повышает отношение PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, к PD1-положительным иммунным эффекторным клеткам, например, Т-клеткам или NK-клеткам.

В одном варианте осуществления популяция Т-клеток характеризуется дефицитом диацилглицеринкиназы (DGK). Клетки с дефицитом DGK включают клетки, которые не экспрессируют DGK в виде РНК или белка или характеризуются сниженной или ингибированной активностью DGK. Клетки с дефицитом DGK можно получить с помощью генетических подходов, например, путем введения средств для РНК-интерференции, например, siRNA, shRNA, miRNA, для снижения или предупреждения экспрессии DGK. В качестве альтернативы клетки с дефицитом DGK можно получить путем обработки ингибиторами DGK, описанными в данном документе.

В одном варианте осуществления популяция Т-клеток характеризуется дефицитом I $\kappa$ B $\alpha$ s. Клетки с дефицитом I $\kappa$ B $\alpha$ s включают клетки, которые не экспрессируют I $\kappa$ B $\alpha$ s в виде РНК или белка или характеризуются сниженной или ингибированной активностью I $\kappa$ B $\alpha$ s; клетки с дефицитом I $\kappa$ B $\alpha$ s можно получить с помощью генетических подходов, например, путем введения средств для РНК-интерференции, например, siRNA, shRNA, miRNA, для снижения или предупреждения экспрессии I $\kappa$ B $\alpha$ s. В качестве альтернативы клетки с дефицитом I $\kappa$ B $\alpha$ s можно получить путем обработки ингибиторами I $\kappa$ B $\alpha$ s, например, леналидомидом.

В вариантах осуществления популяция Т-клеток характеризуется дефицитом DGK и дефицитом I $\kappa$ B $\alpha$ s, например, не экспрессирует DGK и I $\kappa$ B $\alpha$ s или характеризуется сниженной или ингибированной активностью DGK и I $\kappa$ B $\alpha$ s. Такие клетки с дефицитом DGK и I $\kappa$ B $\alpha$ s можно получить с помощью любого из способов, описанных в данном документе.

В варианте осуществления NK-клетки получают от субъекта. В другом варианте осуществления NK-клетки представляют собой линию NK-клеток, например, линию клеток NK-92 (Conkwest).

### Аллогенные CART

В вариантах осуществления, описанных в данном документе, иммунная эффекторная клетка может представлять собой аллогенную иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или NK-клетку. Например, клетка может представлять собой аллогенную Т-клетку, например, аллогенную Т-клетку, в которой отсутствует экспрессия функционального Т-клеточного рецептора (TCR) и/или лейкоцитарного антигена человека (HLA), например, HLA I класса и/или HLA II класса.

Т-клетку, в которой отсутствует функциональный TCR, например, можно сконструировать, чтобы она не экспрессировала какой-либо функциональный TCR на своей поверхности, сконструировать, чтобы она не экспрессировала одну или несколько субъединиц, которые образуют функциональный TCR, или сконструировать, чтобы она продуцировала очень небольшое количество функционального TCR на своей поверхности. В качестве альтернативы Т-клетка может экспрессировать значительно нарушенный TCR, например, за счет экспрессии мутантных или усеченных форм одной или нескольких субъединиц TCR. Термин "значительно нарушенный TCR" означает, что этот TCR не будет вызывать нежелательную иммунную реакцию у хозяина. Такие клетки могут быть созданы посредством применения одной или нескольких систем редактирования гена, описанных в данном документе. В вариантах осуществления система редактирования гена нацеливается на последовательность, кодирующую компонент TCR, например, последовательность в гене константной цепи TCR-альфа (TRAC) или ее регулирующие элементы. В вариантах осуществления система редактирования гена нацеливается на последовательность, кодирующую компонент TCR, например, последовательность в гене константной цепи TCR-бета (TRBC) или ее регулирующие элементы.

Т-клетку, описанную в данном документе, например, можно сконструировать, чтобы она не экспрессировала функциональный HLA на своей поверхности. Например, Т-клетку, описанную в данном документе, можно сконструировать, чтобы экспрессия HLA, например, HLA I класса и/или HLA II класса, на клеточной поверхности была подавлена. Такие клетки могут быть созданы посредством применения одной или нескольких систем редактирования гена, описанных в данном документе. В вариантах осуществления система редактирования гена нацеливается на последовательность, кодирующую компонент одной или нескольких молекул HLA. В вариантах осуществления система редактирования гена нацеливается на последовательность, кодирующую фактор, который влияет на экспрессию одной или нескольких молекул HLA. В вариантах осуществления система редактирования гена нацеливается на регулятор экспрессии молекулы MHC I класса, например, последовательность, кодирующую бета-2 микроглобулин (B2M). В вариантах осуществления система редактирования гена нацеливается на последовательность, кодирующую регулятор экспрессии молекулы MHC II класса, например СИТА. В вариантах осуществления системы редактирования гена, нацеливающиеся как на регулятор экспрессии молекулы MHC I класса (например, B2M), так и на регулятор экспрессии молекулы MHC II (например, СИТА), вводят в клетки,

чтобы подавлять экспрессию по меньшей мере молекулы МНС I класса и по меньшей мере одной молекулы МНС II класса.

В некоторых вариантах осуществления в Т-клетке может отсутствовать функциональный TCR и функциональный HLA, например, HLA I класса и/или HLA II класса.

Модифицированные Т-клетки, в которых отсутствует экспрессия функционального TCR и/или HLA, можно получить любым подходящим способом, в том числе путем нокаута или нокдауна одной или нескольких субъединиц TCR или HLA. Например, можно предусмотреть нокдаун TCR и/или HLA в Т-клетке с помощью siRNA, shRNA, коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), или эндонуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZFN).

В некоторых вариантах осуществления аллогенная клетка может представлять собой клетку, которая не экспрессирует или экспрессирует ингибирующую молекулу на низких уровнях, например, за счет применения любого способа, описанного в данном документе. Например, клетка может представлять собой клетку, которая не экспрессирует или экспрессирует ингибирующую молекулу на низких уровнях, например, молекулу, которая может снижать способность клетки, экспрессирующей CAR, осуществлять иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGF-бета. Ингибирование ингибирующей молекулы, например, за счет ингибирования на уровне ДНК, РНК или белка, может оптимизировать функциональные характеристики клетки, экспрессирующей CAR. В вариантах осуществления можно применять ингибирующую нуклеиновую кислоту, например ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, dsRNA, например, siRNA или shRNA, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или эндонуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), например, описанные в данном документе.

siRNA и shRNA для ингибирования, например, TCR или HLA

В некоторых вариантах осуществления экспрессия TCR и/или экспрессия HLA могут быть ингибированы с использованием siRNA или shRNA, которая нацеливается на нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR и/или HLA в Т-клетке.

Экспрессия siRNA и shRNA в Т-клетках может быть достигнута с использованием любой традиционной системы экспрессии, например, такой как лентивирусная система экспрессии.

Типичные shRNA, которые подавляют экспрессию компонентов TCR, описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2012/0321667. Типичные siRNA и shRNA, которые подавляют экспрессию генов HLA I класса и/или HLA II класса, описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2007/0036773.

CRISPR для ингибирования, например, TCR или HLA

Используемые в данном документе "CRISPR", или "CRISPR для TCR и/или HLA", или "CRISPR для ингибирования TCR и/или HLA" относится к набору коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, или системе, содержащей такой набор повторов. Используемый в данном документе "Cas" относится к CRISPR-ассоциированному белку. Система "CRISPR/Cas" относится к системе, полученной из CRISPR и Cas, которую можно применять для сайленсинга или мутирования гена TCR и/или HLA.

Встречающиеся в природе системы CRISPR/Cas находят в приблизительно 40% секвенированных геномов зубактерий и в 90% секвенированных геномов Archaea. Grissa et al. (2007) BMC Bioinformatics 8: 172. Эта система является типом прокариотической иммунной системы, которая обеспечивает устойчивость к чужеродным генетическим элементам, таким как плазмиды и фаги, и обеспечивает форму адаптивного иммунитета. Barrangou et al. (2007) Science 315: 1709-1712; Marragini et al. (2008) Science 322: 1843-1845.

Система CRISPR/Cas была модифицирована для применения в редактировании генов (сайленсинга, усиления или изменения определенных генов) у эукариот, таких как мыши или приматы. Wiedenheft et al. (2012) Nature 482: 331-8. Это достигается путем введения в эукариотическую клетку плазмиды, содержащей специально сконструированный CRISPR и один или несколько соответствующих Cas.

Последовательность CRISPR, иногда называемая локусом CRISPR, содержит перемежающиеся повторы и спейсеры. Во встречающихся в природе CRISPR спейсеры обычно содержат последовательности, чужеродные для бактерии, такие как плазмидная или фаговая последовательность; в системе CRISPR/Cas для TCR и/или HLA спейсеры получены из последовательности гена TCR или HLA.

РНК из локуса CRISPR конститутивно экспрессируется и процессируется белками Cas в малые РНК. Они содержат спейсер, фланкированный последовательностью повтора. РНК направляют другие белки Cas для сайленсинга экзогенных генных элементов на уровне РНК или ДНК. Horvath et al. (2010) Science 327: 167-170; Makarova et al. (2006) Biology Direct 1: 7. Таким образом, спейсеры служат матрицами для молекул РНК, аналогично siRNA. Pennisi (2013) Science 341: 833-836.

Поскольку они встречаются в природе у многих различных типов бактерий, точное расположение CRISPR и структура, функция и количество генов Cas и их продукт несколько различаются от вида к виду. Haft et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1: e60; Kunin et al. (2007) Genome Biol. 8: R61; Mojica et al. (2005) J. Mol. Evol. 60: 174-182; Bolotin et al. (2005) Microbiol. 151: 2551-2561; Pourcel et al. (2005) Microbiol. 151: 653-663 и Stern et al. (2010) Trends. Genet. 28: 335-340. Например, белки Cse (подтип Cas, E. coli) (например, CasA) образуют функциональный комплекс Cascade, который процессирует транскрипты РНК CRISPR в единицы "спейсер-повтор", которые сохраняет Cascade. Brouns et al. (2008) Science 321: 960-964. У других прокариот Cas6 процессирует транскрипт CRISPR. Для основанной на CRISPR инактивации фагов у E. coli необходимы Cascade и Cas3, но не

Cas1 или Cas2. Белки Cmr (модуль RAMP Cas) у *Pyrococcus furiosus* и других прокариот формируют функциональный комплекс с малыми РНК CRISPR, который распознает и расщепляет комплементарные целевые РНК. Более простая система CRISPR зависит от белка Cas9, который представляет собой нуклеазу с двумя активными сайтами разрезания, по одному на каждую нить двойной спирали. Объединение Cas9 и РНК модифицированного локуса CRISPR может применяться в системе для редактирования гена. Pennisi (2013) *Science* 341: 833-836.

Таким образом, система CRISPR/Cas может применяться для редактирования гена TCR и/или HLA (добавления или делеции одной или нескольких пар оснований) или для введения преждевременного стоп-кодона, что, таким образом, уменьшает экспрессию целевой геномной или хромосомной последовательности, такой как TCR и/или HLA. В качестве альтернативы систему CRISPR/Cas можно использовать, например, подобно РНК-интерференции, отключая ген TCR и/или HLA обратимым образом. Например, в клетке млекопитающего РНК может направлять белок Cas, например, белок Cas, лишенный нуклеазной активности (например, dCas9), к промотору TCR и/или HLA, стерически блокируя РНК-полимеразы.

Могут быть созданы искусственные системы CRISPR/Cas, которые ингибируют, например, TCR и/или HLA, с использованием технологии, известной в данной области техники, например, которая описана в публикации заявки на патент США № 20140068797. Системы CRISPR, которые могут быть применимы в настоящем изобретении, описанном в данном документе, включают описанные, например, в публикации заявки согласно РСТ WO2017/093969, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

TALEN для ингибирования, например, TCR и/или HLA

"TALEN" или "TALEN для HLA и/или TCR" или "TALEN для ингибирования HLA и/или TCR" относится к эффекторной нуклеазе, подобной активаторам транскрипции, искусственной нуклеазе, которая может применяться для редактирования гена HLA и/или TCR.

TALEN получают искусственно путем слияния ДНК-связывающего домена РНК эффектора TAL с доменом расщепления ДНК. Подобные активаторам транскрипции эффекторы (TALE) могут быть сконструированы для связывания любой требуемой последовательности ДНК, в том числе части гена HLA или TCR. Путем объединения сконструированного TALE с доменом расщепления ДНК можно получить рестрикционный фермент, который является специфичным в отношении к любой требуемой последовательности ДНК, в том числе последовательности HLA или TCR. Затем их можно вводить в клетку, где они могут применяться для редактирования генома. Boch (2011) *Nature Biotech.* 29: 135-6 и Boch et al. (2009) *Science* 326: 1509-12; Moscou et al. (2009) *Science* 326: 3501.

TALE представляют собой белки, секретируемые бактериями рода *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен содержит повторяющуюся высококонсервативную

последовательность из 33-34 аминокислот, за исключением 12-ой и 13-ой аминокислот. Эти два положения являются высоковариабельными, демонстрируя сильную корреляцию с распознаванием специфичного нуклеотида. Таким образом, их можно конструировать для связывания с требуемой последовательностью ДНК.

Чтобы получить TALEN, белок TALE сливают с нуклеазой (N), которая представляет собой эндонуклеазу FokI дикого типа или мутированную. Несколько мутаций в FokI были сделаны для его использования в TALEN; например, они улучшают специфичность или активность расщепления. Cermak et al. (2011) *Nucl. Acids Res.* 39: e82; Miller et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 731-734; Wood et al. (2011) *Science* 333: 307; Doyon et al. (2010) *Nature Methods* 8: 74-79; Szczepek et al. (2007) *Nature Biotech.* 25: 786-793, и Guo et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 200: 96.

Домен FokI функционирует как димер, что требует двух конструкций с уникальными ДНК-связывающими доменами для сайтов в целевом геноме с надлежащей ориентацией и расстоянием. Как число аминокислотных остатков между ДНК-связывающим доменом TALE и доменом расщепления FokI, так и число оснований между двумя отдельными сайтами связывания TALEN, по-видимому, являются важными параметрами для достижения высоких уровней активности. Miller et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 143-8.

TALEN для HLA или TCR может применяться внутри клетки для создания двухнитевого разрыва (DSB). Если механизмы репарации неправильно репарируют разрыв посредством негомологичного соединения концов, в сайт разрыва может вводиться мутация. Например, неправильная репарация может привести к ведению мутации со сдвигом рамки. В качестве альтернативы в клетку вместе с TALEN можно вводить чужеродную ДНК; причем в зависимости от последовательностей чужеродной ДНК и хромосомной последовательности данный процесс можно применять для исправления дефекта в гене HLA или TCR или для введения такого дефекта в ген wt HLA или TCR, уменьшая, таким образом, экспрессию HLA или TCR.

TALEN, специфические в отношении последовательностей в HLA или TCR, можно конструировать с использованием любого способа, известного в данной области техники, включающего различные схемы с использованием модульных компонентов. Zhang et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 149-53; Geibler et al. (2011) *PLoS ONE* 6: e19509.

Нуклеаза с "цинковыми пальцами" для ингибирования, например, HLA и/или TCR "ZFN", или "нуклеаза с цинковыми пальцами", или "ZFN для HLA и/или TCR", или "ZFN для ингибирования HLA и/или TCR" относится к нуклеазе с "цинковыми пальцами", искусственной нуклеазе, которая может применяться для редактирования гена HLA и/или TCR.

Подобно TALEN, ZFN содержит домен нуклеазы FokI (или его производное), слитый с ДНК-связывающим доменом. В случае ZFN ДНК-связывающий домен содержит один или несколько "цинковых пальцев". Carroll et al. (2011) *Genetics Society of America* 188: 773-782 и Kim et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1156-1160.



"Цинковый палец" представляет собой небольшой белковый структурный мотив, стабилизированный одним или несколькими ионами цинка. "Цинковый палец" может содержать, например, Cys2His2, и может распознавать последовательность из приблизительно 3 п. о. Разные "цинковые пальцы" с известной специфичностью можно объединять с получением "многопальцевых" полипептидов, которые распознают последовательности из приблизительно 6, 9, 12, 15 или 18 п. о. Для отбора и модульной сборки с созданием "цинковых пальцев" (и их комбинаций), распознающих специфические последовательности, доступны различные методики, в том числе фаговый дисплей, дрожжевые одногибридные системы, бактериальные одногибридные и двухгибридные системы и клетки млекопитающих.

Как и TALEN, ZFN должна димеризоваться, чтобы расщепить ДНК. Таким образом, для нацеливания на непалиндромные сайты ДНК требуется пара ZFN. Две отдельные ZFN должны связывать противоположные нити ДНК, при этом их нуклеазы правильно расположены на расстоянии друг от друга. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10570-5.

Также, подобно TALEN, ZFN может создавать двухнитевой разрыв в ДНК, что при неправильной репарации может создавать мутацию со сдвигом рамки, приводящую к снижению экспрессии и количества HLA и/или TCR в клетке. ZFN также можно использовать с гомологичной рекомбинацией для введения мутации в ген HLA или TCR.

ZFN, специфические по отношению к последовательностям в HLA и/или TCR, можно конструировать с использованием любого способа, известного в данной области техники. Cathomen et al. (2008) Mol. Ther. 16: 1200-7; и Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400: 96.

Активация и размножение иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток)

Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, можно активировать и размножать, обычно с использованием способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041 и публикации заявки на патент США № 20060121005.

Как правило, популяцию иммунных эффекторных клеток по настоящему изобретению можно размножать путем приведения их в контакт с поверхностью, к которой присоединено средство, стимулирующее передачу сигнала, ассоциированного с комплексом CD3/TCR, и лиганд, стимулирующий костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в данном документе, как, например, путем приведения их в контакт с антителом к CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения их в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) совместно с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно привести в

контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации либо CD4+ Т-клеток, либо CD8+ Т-клеток используют антитело к CD3 и антитело к CD28. Примеры антитела к CD28 включают 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diacclone, Безансон, Франция), и их можно использовать, равно как и другие способы, общеизвестные из уровня техники (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Naanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

В определенных аспектах первичный стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для Т-клетки можно обеспечивать с помощью различных протоколов. Например, средства, обеспечивающие каждый сигнал, могут находиться в растворе или быть связаны с поверхностью. В случае, если они связаны с поверхностью, средства могут быть связаны с одной и той же поверхностью (т. е. в "цис"-расположении) или с отдельными поверхностями (т. е. в "транс"-расположении). В качестве альтернативы одно средство может быть связано с поверхностью, а другое средство может находиться в растворе. В одном аспекте средство, обеспечивающее костимулирующий сигнал, связано с поверхностью клетки, а средство, обеспечивающее первичный сигнал активации, находится в растворе или связано с поверхностью. В определенных аспектах оба средства могут находиться в растворе. В одном аспекте средства могут находиться в растворимой форме, а затем сшиваться с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая Fc-рецепторы, или антитело или другое связывающее средство, которое будет связываться с данными средствами. В данном отношении см., например, публикации заявок на патент США №№ 20040101519 и 20060034810 в том, что касается искусственных антигенпрезентирующих клеток (аАРС), которые предусматриваются для применения в активации и размножении Т-клеток в настоящем изобретении.

В одном аспекте два средства иммобилизованы на гранулах - на одной и той же грануле, т. е. в "цис"-расположении, либо на отдельных гранулах, т. е. в "транс"-расположении. В качестве примера, средство, обеспечивающее первичный сигнал активации, представляет собой антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, а средство, обеспечивающее костимулирующий сигнал, представляет собой антитело к CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент; и оба средства совместно иммобилизованы на одной и той же грануле в эквивалентных молекулярных количествах. В одном аспекте для размножения CD4+ Т-клеток и роста Т-клеток для каждого антитела, связанного с гранулами, используют соотношение 1:1. В определенных аспектах настоящего изобретения используют такое соотношение антител к CD3:CD28, связанных с гранулами, при котором наблюдается увеличение интенсивности размножения Т-клеток по сравнению с размножением, наблюдаемым при использовании соотношения 1:1. В одном конкретном аспекте наблюдается увеличение, составляющее от приблизительно 1- до приблизительно 3 раз по сравнению с размножением, наблюдаемым при использовании соотношения 1:1. В одном аспекте соотношение антител к CD3 и CD28, связанных с гранулами, находится в диапазоне от 100:1 до 1:100 и включает все целочисленные

значения в этом промежутке. В одном аспекте настоящего изобретения с частицами связано больше антитела к CD28, чем антитела к CD3, т. е. соотношение антител к CD3 и CD28 составляет меньше единицы. В определенных аспектах настоящего изобретения соотношение антитела к CD28 и антитела к CD3, связанных с гранулами, составляет более 2:1. В одном конкретном аспекте антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, используют в соотношении 1:100. В одном аспекте антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, используют в соотношении 1:75. В дополнительном аспекте антитела к CD3 и CD28, связанные с гранулами, используют в соотношении 1:50. В одном аспекте антитела к CD3 и CD28, связанные с микрогранулами, используют в соотношении 1:30. В одном предпочтительном аспекте антитела к CD3 и CD28, связанные с микрогранулами, используют в соотношении 1:10. В одном аспекте антитела к CD3 и CD28, связанные с микрогранулами, используют в соотношении 1:3. В еще одном аспекте антитела к CD3 и CD28, связанные с микрогранулами, используют в соотношении 3:1.

Для стимуляции Т-клеток или других целевых клеток можно использовать соотношения частиц и клеток от 1:500 до 500:1 с включением любых целочисленных значений в этом промежутке. Как без труда будет понятно специалисту средней квалификации в данной области техники, соотношение частиц и клеток может зависеть от размера частицы относительно целевой клетки. Например, мелкие гранулы могут связывать только несколько клеток, тогда как более крупные гранулы могут связывать множество клеток. В определенных аспектах соотношение клетки и частиц находится в диапазоне от 1:100 до 100:1 и включает любые целочисленные значения в этом промежутке, а в дополнительных аспектах соотношение составляет от 1:9 до 9:1 и включает любые целочисленные значения в этом промежутке, и его также можно использовать для стимуляции Т-клеток. Соотношение частиц, связанных с антителами к CD3 и антителами к CD28, и Т-клеток, которое приводит к стимуляции Т-клеток, может находиться в отмеченном выше диапазоне, однако определенные предпочтительные значения включают 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 и 15:1, при этом одно предпочтительное соотношение частиц и Т-клетки составляет по меньшей мере 1:1. В одном аспекте используют соотношение частиц и клеток 1:1 или меньше. В одном конкретном аспекте предпочтительное соотношение частицы:клетки составляет 1:5. В дополнительных аспектах соотношение частиц и клеток может меняться в зависимости от дня стимуляции. Например, в одном аспекте соотношение частиц и клеток составляет от 1:1 до 10:1 в первый день, и после этого к клеткам ежедневно или раз в два дня добавляют дополнительные частицы в течение не более 10 дней при конечных соотношениях от 1:1 до 1:10 (исходя из числа клеток в день добавления). В одном конкретном аспекте соотношение частиц и клеток составляет 1:1 в первый день стимуляции и доводится до 1:5 в третий и пятый дни стимуляции. В одном аспекте частицы добавляют ежедневно или раз в два дня до конечного соотношения 1:1 в первый день и 1:5 в третий и пятый дни стимуляции. В одном аспекте соотношение частиц и клеток составляет 2:1 в первый день

стимуляции и доводится до 1:10 в третий и пятый дни стимуляции. В одном аспекте частицы добавляют ежедневно или раз в два дня до конечного соотношения 1:1 в первый день и 1:10 в третий и пятый дни стимуляции. Специалисту в данной области техники будет понятно, что множество других соотношений могут подходить для применения в настоящем изобретении. В частности, соотношения будут меняться в зависимости от размера частиц, а также от размера и типа клеток. В одном аспекте наиболее типичные соотношения для применения составляют примерно 1:1, 2:1 и 3:1 в первый день.

В дополнительных аспектах настоящего изобретения клетки, такие как Т-клетки, объединяют с гранулами, покрытыми средством, гранулы и клетки впоследствии разделяют и затем клетки культивируют. В альтернативном аспекте гранулы, покрытые средством, и клетки перед культивированием не разделяют, а культивируют вместе. В дополнительном аспекте гранулы и клетки сначала концентрируют путем приложения силы, такой как магнитная сила, что приводит к увеличению интенсивности лигирования маркеров клеточной поверхности, за счет чего индуцируется стимуляция клеток.

Например, белки клеточной поверхности можно лигировать, позволяя парамагнитным гранулам, к которым присоединены антитела к CD3 и антитела к CD28 (гранулы 3×28), вступать в контакт с Т-клетками. В одном аспекте клетки (например, от  $10^4$  до  $10^9$  Т-клеток) и гранулы (например, парамагнитные гранулы DYNABEADS® M-450 для CD3/CD28 Т в соотношении 1:1) объединяют в буфере, например, PBS (без двухвалентных катионов, таких как кальций и магний). В данном случае специалисты средней квалификации в данной области техники также могут легко оценить любую концентрацию клеток, которая может применяться. Например, целевая клетка может быть очень редкой в образце и составлять только 0,01% образца, или весь образец (т. е. 100%) может содержать целевую клетку, представляющую интерес. Соответственно, любое число клеток находится в рамках настоящего изобретения. В определенных аспектах может потребоваться значительно уменьшить объем, в котором частицы и клетки смешиваются друг с другом (т. е. увеличить концентрацию клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и частиц. Например, в одном аспекте используют концентрацию, составляющую приблизительно 10 миллиардов клеток/мл, 9 миллиардов клеток/мл, 8 миллиардов клеток/мл, 7 миллиардов клеток/мл, 6 миллиардов клеток/мл или 5 миллиардов клеток/мл. В одном аспекте используют более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию клеток, составляющую 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном аспекте используют концентрацию клеток, составляющую от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных аспектах можно использовать концентрации, составляющие 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличению выхода клеток, активации клеток и размножения клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабой экспрессировать представляющие интерес целевые антигены, таких как CD28-отрицательные Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь

терапевтическую ценность, и в определенных аспектах может требоваться их получение. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективный отбор CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые обычно характеризуются более слабой экспрессией CD28.

В одном варианте осуществления клетки, трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, например CAR, описанный в данном документе, размножают, например, с помощью способа, описанного в данном документе. В одном варианте осуществления клетки размножают в культуре в течение периода, составляющего от нескольких часов (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 часа) до приблизительно 14 дней (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней). В одном варианте осуществления клетки размножают в течение периода, составляющего от 4 до 9 дней. В одном варианте осуществления клетки размножают в течение периода, составляющего 8 дней или меньше, например, 7, 6 или 5 дней. В одном варианте осуществления клетки, например, клетку, содержащую, например, экспрессирующую, двойной CAR или тандемный CAR, описанную в данном документе, размножают в культуре в течение 5 дней, и полученные клетки являются более активными, чем те же клетки, размножаемые в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования. Активность можно определить, например, по различным Т-клеточным функциям, например, пролиферации, уничтожению целевых клеток, продуцированию цитокинов, активации, миграции или их комбинациям. В одном варианте осуществления клетки, например, клетка с CAR для CD19, описанная в данном документе, размножаемые в течение 5 дней, демонстрируют по меньшей мере одно-, двух-, трех- или четырехкратное увеличение интенсивности удвоения клеток после стимуляции антигеном по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования. В одном варианте осуществления клетки, например, клетки, содержащие, например, экспрессирующие, двойной CAR или тандемный CAR, описанные в данном документе, размножают в культуре в течение 5 дней, и полученные клетки демонстрируют более высокие уровни продуцирования провоспалительных цитокинов, например, уровни IFN- $\gamma$  и/или GM-CSF, по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 дней тех же условиях культивирования. В одном варианте осуществления клетки, содержащие, например, экспрессирующие, двойной CAR или тандемный CAR, описанные в данном документе, размножаемые в течение 5 дней, демонстрируют по меньшей мере одно-, двух-, трех-, четырех-, пяти-, десятикратное или большее повышение уровней продуцирования провоспалительных цитокинов в пг/мл, например, уровней IFN- $\gamma$  и/или GM-CSF, по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования.

В одном аспекте настоящего изобретения смесь можно культивировать в течение периода, составляющего от нескольких часов (приблизительно 3 часов) до приблизительно 14 дней или имеющего любое целочисленное значение в часах в этом

промежутке. В одном аспекте смесь можно культивировать в течение 21 дня. В одном аспекте настоящего изобретения гранулы и Т-клетки культивируют вместе в течение приблизительно восьми дней. В одном аспекте гранулы и Т-клетки культивируют вместе в течение 2-3 дней. Также могут потребоваться несколько циклов стимуляции, вследствие чего время культивирования Т-клеток может составлять 60 дней или больше. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают соответствующую среду (например, минимальную питательную среду, или среду RPMI 1640, или X-vivo 15 (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, в том числе сыворотку крови (например, фетальную бычью или сыворотку крови человека), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  и TNF- $\alpha$  или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают без ограничения поверхностно-активное вещество, плазманат и восстанавливающие средства, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, бессывороточную среду или дополненную соответствующим количеством сыворотки (или плазмы) крови или определенным набором гормонов и/или количеством цитокина(-ов), достаточным для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, но не в культуры клеток, которые предназначены для инфузии субъекту. Целевые клетки выдерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, соответствующей температуры (например, 37°C) и атмосфере (например, воздух с 5% CO<sub>2</sub>).

В одном варианте осуществления клетки размножают в соответствующей среде (например, среде, описанной в данном документе), которая включает один или несколько интерлейкинов, что приводит к по меньшей мере 200-кратному (например, 200-кратному, 250-кратному, 300-кратному, 350-кратному) увеличению количества клеток в течение 14-дневного периода размножения, например, согласно измерению с помощью способа, описанного в данном документе, такого как проточная цитометрия. В одном варианте осуществления клетки размножают в присутствии IL-15 и/или IL-7 (например, IL-15 и IL-7).

Т-клетки, которые подвергались стимуляции в течение разных периодов времени, могут демонстрировать разные характеристики. Например, в типичных препаратах крови или продуктах, полученных путем афереза мононуклеарных клеток периферической крови, популяция хелперных Т-клеток (TH, CD4+) больше, чем популяция цитотоксических Т-клеток или супрессорных Т-клеток (TC, CD8+). Размножение Т-клеток *ex vivo* путем стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к образованию популяции Т-клеток, которая до приблизительно дней 8-9 состоит преимущественно из TH-клеток, тогда как после приблизительно дней 8-9 популяция Т-клеток содержит все более многочисленную популяцию TC-клеток. Соответственно, в зависимости от цели лечения

инфузия субъекту популяции Т-клеток, содержащей главным образом ТН-клетки, может быть преимущественной. Аналогично, если была выделена антигенспецифическая субпопуляция ТС-клеток, то может быть полезным размножение этой субпопуляции в большей степени.

Кроме того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8, уровни других фенотипических маркеров в значительной степени изменяются, но по большей части воспроизводимо в ходе процесса размножения клеток. Таким образом, подобная воспроизводимость дает возможность адаптировать продукт на основе активированных Т-клеток для конкретных целей.

После конструирования CAR, например, двойного CAR или тандемного CAR, можно применять различные анализы для оценки активности молекулы, как, например, без ограничения способность Т-клеток размножаться после стимуляции антигеном, устойчивое размножение Т-клеток в отсутствие повторной стимуляции и виды противораковой активности, в соответствующих моделях *in vitro* и животных моделях. Анализы для оценки эффектов CAR, например, двойного CAR или тандемного CAR, описаны более подробно ниже.

Анализ экспрессии CAR в первичных Т-клетках посредством вестерн-блоттинга можно применять для определения присутствия мономеров и димеров. См., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, Т-клетки (смесь CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в соотношении 1:1), экспрессирующие CAR, размножают *in vitro* в течение более 10 дней с последующим лизисом и проведением SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. CAR, содержащие полноразмерный цитоплазматический домен TCR- $\zeta$  и эндогенную цепь TCR- $\zeta$ , выявляют с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к цепи TCR- $\zeta$ . Те же субпопуляции Т-клеток используют для анализа посредством SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях для обеспечения оценки образования ковалентных димеров.

Размножение CAR<sup>+</sup> Т-клеток *in vitro* после стимуляции антигеном можно измерить с помощью проточной цитометрии. Например, смесь CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток стимулируют с помощью aAPC с  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28, а затем трансдуцируют лентивирусными векторами, экспрессирующими GFP под контролем промоторов, подлежащих анализу. Иллюстративные промоторы включают промоторы генов IE CMV, EF-1 $\alpha$ , убиквитина С или фосфоглицерокиназы (PGK). Флуоресценцию GFP оценивают с помощью проточной цитометрии в день 6 культивирования в субпопуляциях CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток. См., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). В качестве альтернативы, смесь CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток стимулируют с помощью магнитных гранул, покрытых  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28, в день 0 и трансдуцируют с помощью CAR в день 1 с применением бицистронного лентивирусного вектора, экспрессирующего CAR вместе с eGFP с использованием последовательности 2A для "проскока" рибосомы. Культуры повторно стимулируют с помощью одного из CD19<sup>+</sup> клеток K562 (K562-CD19), клеток K562 дикого типа (K562 дикого типа) или клеток K562, экспрессирующих hCD32 и 4-

1BBL, в присутствии антитела к CD3 и антитела к CD28 (K562-BBL-3/28) после промывания. Экзогенный IL-2 добавляют в культуры раз в два дня из расчета 100 МЕ/мл. Количество GFP<sup>+</sup> Т-клеток устанавливают с помощью проточной цитометрии с применением подсчета по гранулам. См., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Подобные анализы могут быть выполнены с использованием Т-клеток, связывающих CD20 (см., например Gill et al *Blood* 2014;123:2343), или Т-клеток с CAR для CD20.

Также можно измерять уровень устойчивости размножения CAR<sup>+</sup> Т-клеток при отсутствии повторной стимуляции. См., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, измеряют средний объем Т-клеток (фл) в день 8 культивирования с использованием счетчика частиц Coulter Multisizer III, Nexcelom Cellometer Vision или Millipore Scepter после стимуляции с помощью магнитных гранул, покрытых  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28, в день 0 и трансдукции указанным CAR в день 1.

Для измерения активности CART также можно использовать животные модели. Например, можно использовать ксенотрансплантатную модель с использованием CD19-специфичных CAR<sup>+</sup> Т-клеток человека для лечения первичного пре-В ALL человека у иммунодефицитных мышей. См., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Очень коротко, после развития ALL мышей рандомизируют в группы лечения. Различное число сконструированных Т-клеток  $\alpha$ CD19- $\zeta$  и  $\alpha$ CD19-BB- $\zeta$  совместно вводят инъекцией при соотношении 1:1 мышам NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ , несущим В-ALL. Оценивают число копий вектора  $\alpha$ CD19- $\zeta$  и  $\alpha$ CD19-BB- $\zeta$  в ДНК селезенки из мышей в разные моменты времени после инъекции Т-клеток. Животных оценивают в отношении лейкоза с интервалами в одну неделю. Число бластных CD19<sup>+</sup> клеток В-ALL в периферической крови измеряют у мышей, которым вводят инъекцией  $\alpha$ CD19- $\zeta$  CAR<sup>+</sup> Т-клетки или ложнотрансдуцированные Т-клетки. Кривые выживания для групп сравнивают с использованием логарифмического рангового критерия. Кроме того, можно также анализировать абсолютное количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в периферической крови через 4 недели после инъекции Т-клеток мышам NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ . Мышам вводят инъекцией лейкозные клетки и через 3 недели вводят инъекцией Т-клетки, сконструированные для экспрессии CAR с помощью бицистронного лентивирусного вектора, который кодирует CAR, связанный с eGFP. Перед инъекцией Т-клетки нормализуют до 45-50% вводимых GFP<sup>+</sup> Т-клеток путем смешивания с ложнотрансдуцированными клетками и подтверждают с помощью проточной цитометрии. Животных оценивают в отношении лейкоза с интервалами в 1 неделю. Кривые выживаемости для групп, получавших CAR<sup>+</sup> Т-клетки, сравнивают с использованием логарифмического рангового критерия. Подобные эксперименты могут быть проведены с применением Т-клеток с двойным CAR или Т-клеток с тандемным CAR.

Можно оценивать дозозависимый ответ на обработку CAR. См., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Например, периферическую кровь собирают через 35-70 дней после развития лейкоза у мышей, которым в день 21



инъекцировали Т-клетки с CAR, эквивалентное количество ложнотрансдуцированных Т-клеток или не инъекцировали Т-клетки. У мышей из каждой группы случайно отбирают кровь для определения числа бластных CD19<sup>+</sup> клеток ALL периферической крови, а затем их умерщвляют в дни 35 и 49. Остальных животных оценивают в дни 57 и 70. Подобные эксперименты могут быть проведены с применением Т-клеток с двойным CAR или Т-клеток с тандемным CAR.

Оценка клеточной пролиферации и продуцирования цитокинов была описана ранее, например, в Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, оценивание CAR-опосредованной пролиферации выполняют в микротитровальных планшетах путем смешивания отмытых Т-клеток с клетками K562, экспрессирующими CD19 (K19) или CD32 и CD137 (KT32-BBL), до конечного отношения Т-клеток к клеткам K562, составляющего 2:1. До применения клетки K562 облучают гамма-излучением. Моноклональные антитела к CD3 (клон ОКТ3) и антитела к CD28 (клон 9.3) добавляют в культуры с клетками KT32-BBL, которые служат положительным контролем, для стимуляции пролиферации Т-клеток, поскольку эти сигналы поддерживают длительное размножение CD8<sup>+</sup> Т-клеток *ex vivo*. Т-клетки подсчитывают в культурах с использованием флуоресцентных гранул CountBright™ (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) и проточной цитометрии, как это описано производителем. CAR<sup>+</sup> Т-клетки идентифицируют по экспрессии GFP, при этом используют Т-клетки, которые сконструированы с помощью лентивирусных векторов, экспрессирующих CAR, связанные с eGFP-2A. В случае CAR<sup>+</sup> Т-клеток, не экспрессирующих GFP, CAR<sup>+</sup> Т-клетки выявляют с помощью биотинилированного рекомбинантного белка CD19 и вторичного конъюгата авидин-PE. Экспрессию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> на Т-клетках также одновременно выявляют с помощью специфических моноклональных антител (BD Biosciences). Измерения цитокинов выполняют в надосадочных жидкостях, собранных через 24 часа после повторной стимуляции с использованием набора Cytometric Bead Array (BD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США) для определения цитокинов TH1/TH2 человека согласно инструкциям производителя или с использованием набора Luminesx 30-plex (Invitrogen). Флуоресценцию оценивают с использованием проточного цитометра BD Fortessa и данные анализируют в соответствии с инструкциями производителя. Подобные эксперименты могут быть проведены с применением Т-клеток с двойным CAR или Т-клеток с тандемным CAR.

Цитотоксичность может быть оценена стандартным анализом высвобождения <sup>51</sup>Cr. См., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, клетки-мишени (линии K562 и первичные клетки про-B-ALL) нагружают <sup>51</sup>Cr (в виде NaCrO<sub>4</sub>, New England Nuclear, Бостон, Массачусетс, США) при 37°C в течение 2 часов при частом взбалтывании, дважды промывают в полной RPMI и высевают на микротитровальные планшеты. Эффекторные Т-клетки смешивают с целевыми клетками в лунках в полной RPMI при различных отношениях эффекторной клетки к целевой клетке (Е:Т). Также готовят дополнительные лунки, содержащие только среду

(спонтанное высвобождение, SR) или 1% раствор поверхностно-активного вещества тритон-X 100 (суммарное высвобождение, TR). После 4 часов инкубации при 37°C из каждой лунки собирают надосадочную жидкость. Затем высвобожденный  $^{51}\text{Cr}$  измеряют с использованием счетчика гамма-частиц (Packard Instrument Co., Уолтем, Массачусетс, США). Каждое из условий осуществляют в по меньшей мере трех повторностях и вычисляют процентную долю лизиса с использованием формулы: % лизиса =  $(\text{ER} - \text{SR}) / (\text{TR} - \text{SR})$ , где ER представляет собой среднее значение  $^{51}\text{Cr}$ , высвобожденного при каждом экспериментальном условии.

Для оценки специфической миграции и пролиферации CAR на животных моделях, несущих опухоль, можно использовать технологии визуализации. Такие анализы были описаны, например, в Barrett et al., Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011). Вкратце, мышам NOD/SCID/ $\gamma\text{c}^{-/-}$  (NSG) IV инъецируют клетки Nalm-6 с последующей инъекцией через 7 дней T-клеток спустя 4 часа после электропорации с помощью конструкций CAR. T-клетки стабильно трансфицируются лентивирусной конструкцией с экспрессией люциферазы светлячка, и мышей фотографируют для визуализации биолюминесценции. В качестве альтернативы терапевтическую эффективность и специфичность однократной инъекции CAR<sup>+</sup> T-клеток на ксенотрансплантатной модели Nalm-6 можно измерять следующим образом. Мышам NSG вводят инъекцией Nalm-6, трансдуцированные для стабильной экспрессии люциферазы светлячка, а затем через 7 дней в хвостовую вену однократную инъекцию T-клеток, подвергнутых электропорации с CAR. Животных фотографируют для визуализации в различные моменты времени после инъекции. Например, можно получить тепловые карты плотности фотонов для лейкоза, положительного по люциферазе светлячка, у репрезентативных мышей в день 5 (за 2 дня до обработки) и в день 8 (через 24 часа после введения CAR<sup>+</sup> PBL).

Другие анализы, в том числе анализы, описанные в разделе "Примеры" в данном документе, а также анализы, которые известны из уровня техники, также можно применять для оценки конструкций двойного CART или тандемного CART, раскрытых в данном документе.

#### Терапевтическое применение

В настоящем изобретении предусмотрены, среди прочего, композиции и способы лечения рака или заболевания, ассоциированного с экспрессией CD19 и/или CD22, или состояния, ассоциированного с клетками, которые экспрессируют CD19 и/или CD22. В некоторых вариантах осуществления рак или заболевание включают, например, пролиферативное заболевание, такое как рак или злокачественное новообразование, или предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз; или не связанное с раком показание, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют CD19 и/или CD22. В одном аспекте рак или заболевание, ассоциированное с экспрессией CD22, представляет собой гематологический рак. В одном аспекте гематологический рак включает без ограничения B-клеточное злокачественное новообразование. В одном аспекте гематологический рак представляет собой лейкоз или

лимфому. В одном аспекте рак, например, рак, ассоциированный с экспрессией CD19 и/или CD22, включает формы рака и злокачественные новообразования, в том числе без ограничения, например, одну или несколько форм острого лейкоза, в том числе без ограничения В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (BALL), например, BALL у детей и/или BALL у взрослых, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз (TALL), мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз (SLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL); одну или несколько форм хронического лейкоза, в том числе без ограничения хронический миелогенный лейкоз (СМL), хронический лимфоцитарный лейкоз (СLЛ); дополнительные формы гематологического рака или гематологические состояния, в том числе без ограничения лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмцитоподобных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и "предлейкоз" (который представляет собой разнообразную группу гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или дисплазией) миелоидных клеток крови). В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19 и/или CD22, включает без ограничения атипичные и/или не являющиеся классическими формы рака, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие CD19 и/или CD22, и любую их комбинацию.

Также могут быть включены не связанные с раком показания, ассоциированные с экспрессией CD22. Не связанные с раком показания, ассоциированные с экспрессией CD22, включают без ограничения, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанку, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, аутоиммунную гемолитическую анемию, истинную эритроцитарную аплазию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром Эванса, васкулит, буллезные кожные нарушения, сахарный диабет 1 типа, синдром Шегрена, энцефалит с антителами к NMDA-рецепторам и болезнь Девича, офтальмопатию Грейвса и аутоиммунный панкреатит), воспалительные заболевания (аллергию и астму) и трансплантацию.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CD19 и/или CD22. В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения заболевания, где часть опухоли является отрицательной по CD19 и/или CD22, а часть опухоли является положительной по CD19 и/или CD22. Например, CAR по настоящему изобретению применим для лечения субъектов, которые подвергались лечению в отношении заболевания, ассоциированного с

экспрессией CD19 и/или CD22, где у субъекта, который подвергался лечению, связанному с экспрессией CD19 и/или CD22, проявляется заболевание, ассоциированное с экспрессией CD19 и/или CD22.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему CAR, описанный в данном документе, функционально связанный с промотором, для экспрессии в Т-клетках или NK-клетках млекопитающего. В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая CAR, для применения в лечении опухолей, экспрессирующих CD19 и/или CD22, где рекомбинантную Т-клетку, экспрессирующую CAR для CD19 и CAR для CD22, называют Т-клеткой с двойным CAR. В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая CAR, для применения в лечении опухолей, экспрессирующих CD19 и/или CD22, где рекомбинантную Т-клетку, экспрессирующую антигенсвязывающий домен для CD19 и антигенсвязывающий домен для CD22, называют Т-клеткой с тандемным CAR. В одном аспекте Т-клетка с двойным CAR или Т-клетка с тандемным CAR по настоящему изобретению способна приводить опухолевую клетку в контакт с по меньшей мере одним CAR для CD19 или CAR для CD22 по настоящему изобретению, экспрессируемым на ее поверхности, так что CART нацеливается на опухолевую клетку, и рост опухоли подавляется.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу подавления роста опухолевой клетки, экспрессирующей CD19 и/или CD22, включающему приведение опухолевой клетки в контакт с клеткой, экспрессирующей CAR, например, NK-клеткой, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR по настоящему изобретению, так что клетка, экспрессирующая CAR, активируется в ответ на антиген и нацеливается на раковую клетку, при этом рост опухоли подавляется.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта. Способ включает введение субъекту клетки, экспрессирующей CAR, например, клетки, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR по настоящему изобретению, так что у субъекта происходит лечение рака. Пример рака, поддающегося лечению с помощью клетки, экспрессирующей CAR, например, клетки, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR по настоящему изобретению, представляет собой рак, ассоциированный с экспрессией CD22. Пример рака, поддающегося лечению с помощью клетки, экспрессирующей CAR, например, клетки, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR по настоящему изобретению, включает без ограничения гематологический рак, описанный в данном документе. Настоящее изобретение охватывает тип клеточной терапии, при которой клетки генетически модифицируют для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), и при этом клетку, экспрессирующую CAR, вводят посредством инфузии реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная посредством инфузии клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от средств терапии на основе антитела, CAR-модифицированные клетки способны воспроизводиться *in vivo*, что приводит к долгосрочной персистенции,

которая может приводить к устойчивому контролю опухоли. В различных аспектах введенные пациенту Т-клетки или их потомство персистируют у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения Т-клетки пациенту.

В настоящем изобретении также предусмотрен тип клеточной терапии, при котором иммунные эффекторские клетки, например, NK-клетки или Т-клетки, модифицируют, например, с помощью транскрибированной *in vitro* РНК для временной экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), и клетку, -экспрессирующую CAR (например, CART или NK, экспрессирующую CAR), вводят посредством инфузии реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная посредством инфузии клетка способна уничтожать раковые клетки у реципиента. Таким образом, в различных аспектах клетка, экспрессирующая CAR, например, Т- или NK-клетка, введенная пациенту, присутствует в течение менее одного месяца, например, трех недель, двух недель, одной недели после введения клетки, экспрессирующей CAR, например, Т- или NK-клетки, пациенту.

В одном аспекте CAR-модифицированные клетки по настоящему изобретению, например, полностью человеческие клетки, экспрессирующие CAR, могут представлять собой тип вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. В одном аспекте млекопитающее представляет собой человека.

Что касается иммунизации *ex vivo*, то перед введением клетки млекопитающему происходит по меньшей мере одно из следующих событий *in vitro*: i) размножение клеток, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в клетки или iii) криоконсервация клеток.

Процедуры *ex vivo* хорошо известны в данной области техники и более подробно обсуждаются ниже. Вкратце, клетки выделяют из млекопитающего (например, человека) и подвергают генетической модификации (т. е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) с помощью вектора, экспрессирующего CAR, раскрытого в данном документе. CAR-модифицированную клетку можно вводить реципиенту-млекопитающему для обеспечения терапевтической пользы. Реципиентом-млекопитающим может быть человек, и CAR-модифицированная клетка может быть аутологичной по отношению к реципиенту. В качестве альтернативы клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

Процедуру размножения *ex vivo* для гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, описанную в патенте США № 5199942, включенном в данный документ посредством ссылки, можно применять по отношению к клеткам по настоящему изобретению. В данной области техники известны другие подходящие способы, поэтому настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом

размножения клеток *ex vivo*. Вкратце, культивирование и размножение Т-клеток *ex vivo* включает: (1) сбор гемопоэтических стволовых CD34<sup>+</sup> клеток и клеток-предшественников у млекопитающего из образца периферической крови или эксплантатов костного мозга; и (2) размножение таких клеток *ex vivo*. В дополнение к клеточным факторам роста, описанным в патенте США № 5199942, для культивирования и размножения клеток можно применять другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганд c-kit.

В дополнение к применению клеточной вакцины с целью иммунизации *ex vivo*, в настоящем изобретении также предусмотрены композиции и способы иммунизации *in vivo* для развития иммунного ответа, направленного против антигена у пациента.

Обычно клетки, активированные и размноженные, как описано в данном документе, можно использовать в лечении и предупреждении заболеваний, возникающих у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. В частности, CAR-модифицированные клетки по настоящему изобретению применяют в лечении заболеваний, нарушений и состояний, ассоциированных с экспрессией CD22 и/или CD19. В определенных аспектах клетки по настоящему изобретению применяют в лечении пациентов с риском развития заболеваний, нарушений и состояний, ассоциированных с экспрессией CD22 и/или CD19. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения или предупреждения заболеваний, нарушений и состояний, ассоциированных с экспрессией CD22 и/или CD19, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества CAR-модифицированных клеток по настоящему изобретению.

В одном аспекте клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, можно применять для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественное новообразование, или которое представляет собой предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз. В одном аспекте рак, ассоциированный с экспрессией CD22 и/или CD19, представляет собой гематологический рак, предлейкоз, гиперпролиферативное нарушение, гиперплазию или дисплазию, которая характеризуется аномальным ростом клеток.

В одном аспекте клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, применяют для лечения рака, где рак представляет собой гематологический рак. Состояния, связанные с гематологическим раком, представляют собой типы рака, такие как лейкоз и злокачественные лимфопролиферативные состояния, при которых поражается кровь, костный мозг и лимфатическая система.

Лейкоз может быть классифицирован как острый лейкоз и хронический лейкоз. Острый лейкоз может быть дополнительно классифицирован как острый миелогенный лейкоз (AML) и острый лимфобластный лейкоз (ALL). Хронический лейкоз включает хронический миелогенный лейкоз (CMML) и хронический лимфоидный лейкоз (CLL). Другие связанные состояния включают миелодиспластические синдромы (MDS, ранее известные как "предлейкоз"), которые представляют собой разнообразную группу гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или

дисплазией) миелоидных клеток крови и риском трансформации в АМЛ.

Лимфома представляет собой группу опухолей из клеток крови, которые развиваются из лимфоцитов. Иллюстративные формы лимфомы включают неходжкинскую лимфому и лимфому Ходжкина.

В одном аспекте композиции и клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, являются особенно применимыми для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, таких как формы неходжкинской лимфомы, например, DLBCL, фолликулярная лимфома или CLL.

Неходжкинская лимфома (NHL) представляет собой группу форм рака из лимфоцитов, образованных либо из В-клеток, либо из Т-клеток. NHL возникают в любом возрасте и зачастую характеризуются лимфатическими узлами, которые больше, чем нормальные, потерей веса и лихорадкой. Различные типы NHL классифицируются как агрессивные (быстрорастущие) и вялотекущие (медленнорастущие) типы. Формы В-клеточной неходжкинской лимфомы включают лимфому Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (CLL/SLL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников и лимфому из клеток мантийной зоны. Примеры форм Т-клеточной неходжкинской лимфомы включают фунгоидную гранулему, анапластическую крупноклеточную лимфому и Т-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников. Лимфомы, которые возникают после трансплантации костного мозга или стволовых клеток, как правило, представляют собой формы В-клеточной неходжкинской лимфомы. См., например, Maloney. NEJM. 366,21(2012):2008-16.

Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) представляет собой форму NHL, которая развивается из В-клеток. DLBCL представляет собой агрессивную лимфому, которая может возникать в лимфатических узлах или за пределами лимфатической системы, например, в желудочно-кишечном тракте, семенниках, щитовидной железе, коже, молочной железе, кости или головном мозге. При DLBCL обычно наблюдаются три варианта клеточной морфологии: центробластный, иммунобластный и анапластический. Центробластная морфология является наиболее распространенной и характеризуется внешним видом лимфоцитов от среднего до крупного размера с минимальной цитоплазмой. Существует несколько подтипов DLBCL. Например, первичная лимфома центральной нервной системы представляет собой тип DLBCL, который поражает только головной мозг и лечится отличным образом от DLBCL, которая поражает области за пределами головного мозга. Другой тип DLBCL представляет собой первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, которая зачастую возникает у более молодых пациентов и быстро растет в грудной клетке. Симптомы DLBCL включают безболезненную быструю отечность в области шеи, подмышек или паха, которая вызвана увеличением лимфатических узлов. Для некоторых субъектов отечность может быть болезненной. Другие симптомы DLBCL включают

ночную потливость, необъяснимую лихорадку и потерю веса. Несмотря на то, что большинство пациентов с DLBCL являются взрослыми, это заболевание иногда встречается у детей. Лечение DLBCL включает химиотерапию (например, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизон, этопозид), антитела (например, ритуксан), облучение или трансплантации стволовых клеток.

Фолликулярная лимфома, тип неходжкинской лимфомы, представляет собой лимфому из В-клеток центра фолликула (центроцитов и центробластов), которая характеризуется по меньшей мере частичным фолликулярным паттерном. Клетки фолликулярной лимфомы экспрессируют В-клеточные маркеры CD10, CD19, CD20 и CD22. Клетки фолликулярной лимфомы обычно являются отрицательными по CD5. Морфологически опухоль при фолликулярной лимфоме состоит из фолликулов, содержащих смесь центроцитов (также называемых рассеченными клетками или мелкими клетками центрального фолликула) и центробластов (также называемых крупными нерассеченными клетками или крупными клетками центрального фолликула). Фолликулы окружены клетками, не являющимися злокачественными, преимущественно Т-клетками. Фолликулы содержат главным образом центроциты с незначительным количеством центробластов. В соответствии с определением Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) морфологические степени являются следующими: степень 1 (<5 центробластов в поле зрения при большом увеличении (hpf)); степень 2 (6-15 центробластов/hpf); степень 3 (>15 центробластов/hpf). Степень 3 дополнительно подразделяют на следующие степени: степень 3А (центроциты все еще присутствуют); степень 3В (фолликул состоит почти целиком из центробластов). Лечение фолликулярной лимфомы включает химиотерапию, например, алкилирующие средства, аналоги нуклеозидов, схемы лечения, включающие антрациклин, например, комбинированная терапия, называемая СНОР - циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизон/преднизолон, антитела (например, ритуксимаб), радиоиммунотерапию и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток.

CLL представляет собой злокачественное новообразование из В-клеток, характеризующееся пролиферацией и накоплением неопластических клеток в костном мозге, крови, лимфатических узлах и селезенке. Среднее значение возраста во время постановки диагноза CLL составляет приблизительно 65 лет. Современные виды лечения включают химиотерапию, лучевую терапию, биологическую терапию или трансплантацию костного мозга. Иногда симптомы лечат путем хирургического вмешательства (например, спленэктомическое удаление увеличенной селезенки) или с помощью лучевой терапии (например, циторедукция набухших лимфатических узлов). Химиотерапевтические средства для лечения CLL включают, например, флударабин, 2-хлордезоксиденозин (кладрибин), хлорамбуцил, винкристин, пентостатин, циклофосфамид, алемтузумаб (кампат-1Н), доксорубин и преднизон. Биологическая терапия CLL включает антитела, например, алемтузумаб, ритуксимаб и офатумумаб; а также средства терапии на основе ингибиторов тирозинкиназы. Для классификации стадии CLL может быть использован целый ряд критериев, например, система Rai или



Binet. В системе Rai описано, что CLL характеризуется наличием пяти стадий: стадия 0, при которой присутствует только лимфоцитоз; стадия I, при которой присутствует лимфаденопатия; стадия II, при которой присутствуют спленомегалия, лимфаденопатия или обе; стадия III, при которой присутствуют анемия, органомегалия или обе (прогрессирование определяется по потере веса, утомляемости, лихорадке, массивной органомегалии и быстро возрастающем количестве лимфоцитов); и стадия IV, при которой присутствуют анемия, тромбоцитопения, органомегалия или их комбинация. В соответствии с системой определения стадий по Binet существуют три категории: стадия A, при которой присутствует лимфоцитоз и увеличены менее трех лимфатических узлов (эта стадия включает всех пациентов со стадией 0 по Rai, половину пациентов со стадией I по Rai и треть пациентов со стадией II по Rai); стадия B, при которой вовлечены три или более лимфатических узла; и стадия C, при которой присутствуют анемия или тромбоцитопения или обе. Эти системы классификации можно комбинировать с измерениями мутации генов иммуноглобулинов для получения более точных характеристик течения заболевания. Наличие мутированных генов иммуноглобулинов коррелирует с улучшенным прогнозом.

В другом варианте осуществления клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, применяют для лечения форм рака или форм лейкоза, например, с помощью лейкозных стволовых клеток. Например, лейкозные стволовые клетки представляют собой лейкозные CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> клетки.

В настоящем изобретении предусмотрены, среди прочего, композиции и способы лечения рака. В одном аспекте рак представляет собой гематологический рак, включающий без ограничения одну или несколько форм острого лейкоза, в том числе без ограничения В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (BALL), например, BALL у детей и/или BALL у взрослых, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз (TALL), мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз (SLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL); одну или несколько форм хронического лейкоза, в том числе без ограничения хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); дополнительные формы гематологического рака или гематологические состояния, в том числе без ограничения лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмцитоподобных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и "предлейкоз", который представляет собой разнообразную группу гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или дисплазией) миелоидных клеток крови, а также

заболевание, ассоциированное с экспрессией CD22, включает без ограничения атипичные и/или не являющиеся классическими формы рака, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие CD22; и любую их комбинацию.

CAR-модифицированные клетки по настоящему изобретению можно вводить как отдельно, так и в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток.

В другом аспекте клетка, экспрессирующая CAR, например, клетки, экспрессирующие двойной CAR или тандемный CAR по настоящему изобретению, можно применять для лечения субъекта, ранее получавшего лечение с применением клетки, экспрессирующей CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую CAR по настоящему изобретению, вводят после рецидива рака или другого состояния, которое ранее лечили клеткой, экспрессирующей CAR для CD19.

В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние характеризуется экспрессией CD19. В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние характеризуется экспрессией CD22. В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние характеризуется экспрессией CD19 и CD22.

В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние ранее не демонстрировали ответ на клетку, экспрессирующую CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние у субъекта демонстрирует ответ на лечение клеткой, экспрессирующей CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние демонстрировали лучший ответ на лечение клеткой, экспрессирующей CAR для CD19, чем в настоящее время. В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние демонстрировали ответ на лечение клеткой, экспрессирующей CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние демонстрировали ответ на лечение клеткой, экспрессирующей CAR для CD19, и больше не демонстрируют ответ на клетку, экспрессирующую CAR для CD19.

В некоторых вариантах осуществления CAR, например, двойной CAR или тандемный CAR (например, описанные в данном документе), вводят из-за снижения или потери способности демонстрировать ответ на клетку, экспрессирующую CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе клетки, экспрессирующей CAR для CD19, была прекращена. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе CAR для CD19 была прекращена из-за снижения или потери демонстрации ответа на клетку, экспрессирующую CAR для CD19.

В некоторых вариантах осуществления CAR, например, двойной CAR или тандемный CAR (например, описанные в данном документе), вводят из-за снижения или потери способности демонстрировать ответ на клетку, экспрессирующую CAR для CD22. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе клетки, экспрессирующей CAR

для CD22, была прекращена. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе CAR для CD22 была прекращена из-за снижения или потери демонстрации ответа на клетку, экспрессирующую CAR для CD22.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы предупреждения, лечения и/или контроля заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD22 (например, гематологического рака или атипичного рака, экспрессирующего CD22), при этом способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, клетки, экспрессирующей CAR для CD22 по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей CD22. В одном аспекте субъект представляет собой человека. Неограничивающие примеры нарушений, ассоциированных с клетками, экспрессирующими CD22, включают аутоиммунные заболевания (например, волчанку, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, аутоиммунную гемолитическую анемию, истинную эритроцитарную аплазию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром Эванса, васкулит, буллезные кожные нарушения, сахарный диабет 1 типа, синдром Шегрена, энцефалит с антителами к NMDA-рецепторам и болезнь Девича, офтальмопатию Грейвса и аутоиммунный панкреатит), воспалительные заболевания (аллергию и астму), трансплантацию и раковые заболевания (такие как формы гематологического рака или атипичные формы рака, экспрессирующие CD22).

В настоящем изобретении также предусмотрены способы предупреждения, лечения и/или контроля заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD22, при этом способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, клетки, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей CD22. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления субъект не демонстрирует ответ на терапию на основе CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует частичный ответ на терапию на основе CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует полный ответ на терапию на основе CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления субъект не демонстрирует рецидив заболевания при терапии на основе CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует рецидив заболевания при терапии на основе для CD19.

В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние, которые ранее демонстрировали ответ на лечение клетками, экспрессирующими CAR для CD19, не экспрессируют CD19. В некоторых вариантах осуществления для рака или другого состояния, которые ранее демонстрировали ответ на лечение клетками, экспрессирующими CAR для CD19, характерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или большее снижение уровней экспрессии CD19 по сравнению с тем, когда рак или другое состояние демонстрировали ответ на лечение клетками, экспрессирующими CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние, которые ранее

демонстрировали ответ на лечение клетками, экспрессирующими CAR для CD19, экспрессируют CD22.

В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую CAR, например, клетку, экспрессирующую двойной CAR или тандемный CAR, по настоящему изобретению, вводят после рецидива рака или другого состояния, которое ранее лечили клеткой, экспрессирующей CAR для CD19.

#### Абляция костного мозга

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены композиции и способы абляции костного мозга. Например, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены композиции и способы эрадикации по меньшей мере части имеющегося костного мозга у субъекта. В данном документе описано, что, в определенных случаях, клетка, экспрессирующая CAR, например, клетки, экспрессирующие двойной CAR или тандемный CAR, содержащие CAR для CD22 и CAR для CD19 по настоящему изобретению, приводит к эрадикации CD19- и/или CD22-положительных миелоидных клеток-предшественников костного мозга.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ абляции костного мозга, включающий введение клетки, экспрессирующей CAR, например, клетки, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR по настоящему изобретению, субъекту, нуждающемуся в абляции костного мозга. Например, способ по настоящему изобретению может применяться для эрадикации некоторой части или всего имеющегося костного мозга субъекта, у которого имеется заболевание или нарушение, при котором трансплантация костного мозга или рекондиционирование костного мозга является стратегией благоприятного лечения. В одном аспекте способ абляции костного мозга по настоящему изобретению, включающий введение клетки, экспрессирующей CAR, например, клетки, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR, описанные в другом разделе в данном документе, выполняют у субъекта перед трансплантацией костного мозга. Таким образом, в одном аспекте способ по настоящему изобретению обеспечивает схему кондиционирования клеток перед трансплантацией костного мозга или стволовых клеток. В одном аспекте трансплантация костного мозга включает трансплантацию стволовой клетки. Трансплантация костного мозга может включать трансплантацию аутологичных или аллогенных клеток.

В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение клетки, экспрессирующей CAR, например, клетки, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR по настоящему изобретению, для эрадикации по меньшей мере части имеющегося костного мозга. Способ может применяться как по меньшей мере часть схемы лечения для лечения любого заболевания или нарушения, при котором благоприятна трансплантация костного мозга. То есть способ по настоящему изобретению может применяться у любого субъекта, нуждающегося в трансплантации костного мозга. В одном аспекте абляция костного мозга, включающая введение клетки, экспрессирующей CAR, например, клетки,

экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR, применима в лечении AML. В некоторых аспектах абляция костного мозга с помощью способа по настоящему изобретению применима в лечении гематологического рака, солидной опухоли, гематологического заболевания, метаболического нарушения, HIV, HTLV, лизосомальной болезни накопления и иммунодефицита.

Композиции и способы, раскрытые в данном документе, могут применяться для эрадикации по меньшей мере части имеющегося костного мозга для лечения форм гематологического рака, в том числе без ограничения форм рака, описанных в данном документе, например, лейкоза, лимфомы, миеломы, ALL, AML, CLL, CML, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (например, DLBCL или фолликулярной лимфомы) и множественной миеломы.

Композиции и способы, раскрытые в данном документе, могут применяться для лечения гематологических заболеваний, в том числе без ограничения, среди прочих, миелодисплазии, анемии, пароксизмальной ночной гемоглобинурии, апластической анемии, приобретенной истинной эритроцитарной аплазии, анемии Диамона-Блэкфана, анемии Фанкони, цитопении, амегакариоцитарной тромбоцитопении, миелопролиферативных нарушений, истинной полицитемии, эссенциального тромбоцитоза, миелофиброза, гемоглобинопатий, серповидно-клеточной анемии, большой  $\beta$ -талассемии.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения рака, включающий кондиционирование костного мозга, где эрадикацию по меньшей мере части костного мозга субъекта осуществляют с применением клетки, экспрессирующей CAR, например, клетки, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR по настоящему изобретению. Например, в определенных случаях костный мозг субъекта содержит злокачественную клетку-предшественника, на которую может нацеливаться клетка, экспрессирующая CAR, например, клетка, экспрессирующей двойной CAR или тандемный CAR, и элиминировать ее с помощью своей активности. В одном аспекте терапия на основе кондиционирования костного мозга включает введение трансплантата костного мозга или стволовых клеток субъекту после эрадикации нативного костного мозга. В одном аспекте терапию на основе рекондиционирования костного мозга комбинируют с одним или несколькими другими видами противораковой терапии, в том числе без ограничения с видами противоопухолевой терапии на основе CAR, химиотерапией, облучением и т. п.

В одном аспекте, перед инфузией трансплантата костного мозга или стволовых клеток может потребоваться эрадикация введенной клетки, экспрессирующей CAR. Эрадикацию клетки, экспрессирующей CAR, можно осуществлять с применением любой подходящей стратегии или лечения, в том числе без ограничения применения "суицидального" гена, ограниченной персистенции CAR с применением CAR, кодируемых РНК, или методов против Т-клеток, включающих антитела или химиотерапию.

### Заболевания и/или нарушения, ассоциированные с CD22

В настоящем изобретении предусмотрены, среди прочего, композиции и способы лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CD22, или состояния, ассоциированного с клетками, которые экспрессируют CD22, в том числе, например, пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественного новообразования, или предракового состояния; или не связанного с раком показания, ассоциированного с клетками, которые экспрессируют CD22. В одном аспекте рак, ассоциированный с экспрессией CD22, представляет собой гематологический рак. В одном аспекте гематологический рак включает без ограничения В-клеточное злокачественное новообразование. В одном аспекте гематологический рак представляет собой лейкоз или лимфому. В одном аспекте рак, ассоциированный с экспрессией CD22, включает формы рака и злокачественные новообразования, в том числе без ограничения, например, одну или несколько форм острого лейкоза, в том числе без ограничения В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (BALL), например, BALL у детей и/или BALL у взрослых, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз (TALL), мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз (SLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL); одну или несколько форм хронического лейкоза, в том числе без ограничения хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); дополнительные формы гематологического рака или гематологические состояния, в том числе без ограничения лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфолиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток маргинальной зоны, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмцитоподобных дендритных клеток и макроглобулинемию Вальденстрема. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с экспрессией CD22, включает без ограничения атипичные и/или не являющиеся классическими формы рака, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие CD22; и любую их комбинацию.

Также могут быть включены не связанные с раком показания, ассоциированные с экспрессией CD22. Не связанные с раком показания, ассоциированные с экспрессией CD22, включают без ограничения, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанку, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, аутоиммунную гемолитическую анемию, истинную эритроцитарную аплазию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром Эванса, васкулит, буллезные кожные нарушения, сахарный диабет 1 типа, синдром Шегрена, энцефалит с антителами к NMDA-рецепторам и болезнь Девича, офтальмопатию Грейвса и аутоиммунный панкреатит), воспалительные заболевания (аллергию и астму) и трансплантацию твердого органа или гемопоэтических клеток.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения

заболевания, ассоциированного с экспрессией CD22. В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения заболевания, где часть опухоли является отрицательной по CD22, а часть опухоли является положительной по CD22. Например, CAR по настоящему изобретению применим для лечения субъектов, которые подвергались лечению в отношении заболевания, ассоциированного с экспрессией CD22, где субъект, который подвергался лечению заболевания, связанного с экспрессией CD22, демонстрирует заболевание, ассоциированное с экспрессией CD22.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему CAR, например, двойной CAR или тандемный CAR, функционально связанный с промотором, для экспрессии в клетках млекопитающих (например, Т-клетках или НК-клетках). В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая CAR, например, двойной CAR или тандемный CAR, для применения в лечении опухолей, экспрессирующих CD22. В одном аспекте Т-клетка или НК-клетка, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, способны приводить опухолевую клетку в контакт с по меньшей мере одним CAR по настоящему изобретению, экспрессируемым на их поверхности, так что Т-клетка или НК-клетка, экспрессирующие CAR, нацеливаются на опухолевую клетку и рост опухоли подавляется.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу подавления роста опухолевой клетки, экспрессирующей CD22, включающему приведение опухолевой клетки в контакт с клеткой с CAR (например, Т-клеткой или НК-клеткой) по настоящему изобретению, так что CART активируется в ответ на антиген и нацеливается на раковую клетку, при этом рост опухоли подавляется.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта. Способ включает введение субъекту клетки, экспрессирующей CAR (например, Т-клетки или НК-клетки) по настоящему изобретению, так что осуществляется лечение рака у субъекта. Пример рака, поддающегося лечению клеткой, экспрессирующей CAR (например, Т-клеткой или НК-клеткой) по настоящему изобретению, представляет собой рак, ассоциированный с экспрессией CD22. Пример рака, поддающегося лечению клеткой, экспрессирующей CAR (например, Т-клеткой или НК-клеткой) по настоящему изобретению, включает без ограничения гематологический рак, описанный в данном документе.

Настоящее изобретение включает тип клеточной терапии, при которой клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) генетически модифицируют для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), и CAR-экспрессирующую клетку (например, Т-клетку или НК-клетку) вводят посредством инфузии реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная посредством инфузии клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапевтических средств на основе антитела, CAR-модифицированные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) способны реплицироваться *in vivo*, что приводит в результате к долгосрочной персистенции, которая может приводить к длительному контролю опухоли. В различных аспектах клетки

(например, Т-клетки или НК-клетки), вводимые пациенту, или их потомство, персистируют у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения Т-клетки пациенту.

Настоящее изобретение также предусматривает тип клеточной терапии, при котором иммунные эффекторские клетки, например НК-клетки или Т-клетки, модифицируют, например, с помощью транскрибированной *in vitro* РНК, для временной экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), и CAR-экспрессирующую клетку (например, НК-клетку, экспрессирующую CART или CAR), вводят посредством инфузии реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная посредством инфузии клетка способна уничтожать раковые клетки у реципиента. Таким образом, в различных аспектах CAR-экспрессирующие клетки, например Т-клетки или НК-клетки, вводимые пациенту, присутствуют в течение менее одного месяца, например, в течение трех недель, двух недель, одной недели после введения пациенту CAR-экспрессирующей клетки, например Т-клетки или НК-клетки.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, противоопухолевый иммунный ответ, вызванный CAR-модифицированными клетками (например, Т-клетками или НК-клетками), может являться активным или пассивным иммунным ответом, или, как альтернатива, может быть обусловлен прямым или косвенным иммунным ответом. В одном аспекте CAR-трансдуцированные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) характеризуются специфической секрецией провоспалительных цитокинов и выраженной цитолитической активностью в ответ на опухолевые клетки человека, экспрессирующие CD22, противодействуют ингибированию со стороны растворимого CD22, опосредуют неспецифический цитолиз и опосредуют регрессию развившейся опухоли у человека. Например, не содержащие антигена опухолевые клетки в пределах гетерогенной области опухоли, экспрессирующей CD22, могут поддаваться косвенному разрушению под действием CD22-перенаправленных Т-клеток, которые ранее реагировали на прилегающие антиген-положительные раковые клетки.

В одном аспекте клетки с CAR (например, Т-клетки или НК-клетки) по настоящему изобретению, например, полностью человеческие клетки, экспрессирующие CAR, могут представлять собой тип вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. В одном аспекте млекопитающее представляет собой человека.

Что касается иммунизации *ex vivo*, то перед введением клетки млекопитающему происходит по меньшей мере одно из следующих событий *in vitro*: i) размножение клеток, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в клетки или iii) криоконсервация клеток.



Процедуры *ex vivo* хорошо известны в данной области техники и более подробно обсуждаются ниже. Вкратце, клетки выделяют из млекопитающего (например, человека) и подвергают генетической модификации (т. е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) с помощью вектора, экспрессирующего CAR, раскрытого в данном документе. Клетку с CAR можно вводить реципиенту-млекопитающему для обеспечения терапевтической пользы. Реципиент-млекопитающее может представлять собой человека, и клетка с CAR может являться аутологичной по отношению к реципиенту. В качестве альтернативы клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

Процедуру размножения *ex vivo* для гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, описанную в патенте США № 5199942, включенном в данный документ посредством ссылки, можно применять в отношении клеток по настоящему изобретению. В данной области техники известны другие подходящие способы, поэтому настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом размножения клеток *ex vivo*. Вкратце, культивирование и размножение Т-клеток *ex vivo* включает: (1) сбор гемопоэтических стволовых CD34+ клеток и клеток-предшественников у млекопитающего из образца периферической крови или эксплантатов костного мозга; и (2) размножение таких клеток *ex vivo*. В дополнение к клеточным факторам роста, описанным в патенте США № 5199942, для культивирования и размножения клеток можно применять другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганд c-kit.

В дополнение к применению клеточной вакцины с целью иммунизации *ex vivo*, в настоящем изобретении также предусмотрены композиции и способы иммунизации *in vivo* для развития иммунного ответа, направленного против антигена у пациента.

Обычно клетки, активированные и размноженные, как описано в данном документе, можно использовать в лечении и предупреждении заболеваний, возникающих у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. В частности, CAR-модифицированные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) по настоящему изобретению применяют в лечении заболеваний, нарушений и состояний, ассоциированных с экспрессией CD22. В некоторых аспектах клетки по настоящему изобретению применяют в лечении пациентов с риском развития заболеваний, нарушений и состояний, ассоциированных с экспрессией CD22. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения или предупреждения заболеваний, нарушений и состояний, ассоциированных с экспрессией CD22, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества клеток с CAR (например, Т-клеток или НК-клеток) по настоящему изобретению.

В одном аспекте клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, можно применять для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак, или злокачественное новообразование, или предраковое состояние. В одном аспекте рак, ассоциированный с экспрессией CD22, представляет собой гематологический рак, предлейкоз, гиперпролиферативное нарушение, гиперплазию или дисплазию, которая

характеризуется аномальным ростом клеток.

В одном аспекте клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, применяют для лечения рака, где рак представляет собой гематологический рак. Состояния, связанные с гематологическим раком, представляют собой типы рака, такие как лейкоз и злокачественные лимфопролиферативные состояния, при которых поражается кровь, костный мозг и лимфатическая система.

Лейкоз может быть классифицирован как острый лейкоз и хронический лейкоз. Острый лейкоз может быть дополнительно классифицирован как острый миелогенный лейкоз (AML) и острый лимфобластный лейкоз (ALL). Хронический лейкоз включает хронический миелогенный лейкоз (CMML) и хронический лимфоидный лейкоз (CLL). Другие связанные состояния включают миелодиспластические синдромы (MDS, ранее известные как "предлейкоз"), которые представляют собой разнообразную группу гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или дисплазией) миелоидных клеток крови и риском трансформации в AML.

Лимфома представляет собой группу опухолей из клеток крови, которые развиваются из лимфоцитов. Иллюстративные формы лимфомы включают неходжкинскую лимфому и лимфому Ходжкина.

В одном аспекте композиции и CAR-T-клетки или NK-клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, особенно применимы для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, таких как формы неходжкинской лимфомы, например, DLBCL, фолликулярной лимфомы или CLL.

Неходжкинская лимфома (NHL) представляет собой группу форм рака из лимфоцитов, образованных либо из В-клеток, либо из Т-клеток. NHL возникают в любом возрасте и зачастую характеризуются лимфатическими узлами, которые больше, чем нормальные, потерей веса и лихорадкой. Различные типы NHL классифицируются как агрессивные (быстрорастущие) и вялотекущие (медленнорастущие) типы. Формы В-клеточной неходжкинской лимфомы включают лимфому Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (CLL/SLL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников и лимфому из клеток мантийной зоны. Примеры форм Т-клеточной неходжкинской лимфомы включают фунгоидную гранулему, анапластическую крупноклеточную лимфому и Т-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников. Лимфомы, которые возникают после трансплантации костного мозга или стволовых клеток, как правило, представляют собой формы В-клеточной неходжкинской лимфомы. См., например, Maloney. NEJM. 366,21(2012):2008-16.

Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) представляет собой форму NHL, которая развивается из В-клеток. DLBCL представляет собой агрессивную лимфому, которая может возникать в лимфатических узлах или за пределами лимфатической системы, например, в желудочно-кишечном тракте, семенниках,

щитовидной железе, коже, молочной железе, кости или головном мозге. При DLBCL обычно наблюдаются три варианта клеточной морфологии: центробластный, иммунобластный и анапластический. Центробластная морфология является наиболее распространенной и характеризуется внешним видом лимфоцитов от среднего до крупного размера с минимальной цитоплазмой. Существует несколько подтипов DLBCL. Например, первичная лимфома центральной нервной системы представляет собой тип DLBCL, который поражает только головной мозг и лечится отличным образом от DLBCL, которая поражает области за пределами головного мозга. Другой тип DLBCL представляет собой первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, которая зачастую возникает у более молодых пациентов и быстро растет в грудной клетке. Симптомы DLBCL включают безболезненную быструю отечность в области шеи, подмышек или паха, которая вызвана увеличением лимфатических узлов. Для некоторых субъектов отечность может быть болезненной. Другие симптомы DLBCL включают ночную потливость, необъяснимую лихорадку и потерю веса. Несмотря на то, что большинство пациентов с DLBCL являются взрослыми, это заболевание иногда встречается у детей. Лечение DLBCL включает химиотерапию (например, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизон, этопозид), антитела (например, ритуксан), облучение или трансплантации стволовых клеток.

Фолликулярная лимфома, тип неходжкинской лимфомы, представляет собой лимфому из В-клеток центра фолликула (центроцитов и центробластов), которая характеризуется по меньшей мере частичным фолликулярным паттерном. Клетки фолликулярной лимфомы экспрессируют В-клеточные маркеры CD10, CD19, CD20 и CD22. Клетки фолликулярной лимфомы обычно являются отрицательными по CD5. Морфологически опухоль при фолликулярной лимфоме состоит из фолликулов, содержащих смесь центроцитов (также называемых рассеянными клетками или мелкими клетками центрального фолликула) и центробластов (также называемых крупными нерассеянными клетками или крупными клетками центрального фолликула). Фолликулы окружены клетками, не являющимися злокачественными, преимущественно Т-клетками. Фолликулы содержат главным образом центроциты с незначительным количеством центробластов. В соответствии с определением Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) морфологические степени являются следующими: степень 1 (<5 центробластов в поле зрения при большом увеличении (hpf)); степень 2 (6-15 центробластов/hpf); степень 3 (>15 центробластов/hpf). Степень 3 дополнительно подразделяют на следующие степени: степень 3А (центроциты все еще присутствуют); степень 3В (фолликул состоит почти целиком из центробластов). Лечение фолликулярной лимфомы включает химиотерапию, например, алкилирующие средства, аналоги нуклеозидов, схемы лечения, включающие антрациклин, например, комбинированная терапия, называемая СНОР - циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизон/преднизолон, антитела (например, ритуксимаб), радиоиммунотерапию и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток.

CLL представляет собой злокачественное новообразование из В-клеток,

характеризующееся пролиферацией и накоплением неопластических клеток в костном мозге, крови, лимфатических узлах и селезенке. Среднее значение возраста во время постановки диагноза CLL составляет приблизительно 65 лет. Современные виды лечения включают химиотерапию, лучевую терапию, биологическую терапию или трансплантацию костного мозга. Иногда симптомы лечат путем хирургического вмешательства (например, спленэктомическое удаление увеличенной селезенки) или с помощью лучевой терапии (например, циторедукция набухших лимфатических узлов). Химиотерапевтические средства для лечения CLL включают, например, флударабин, 2-хлордезоксиденозин (кладрибин), хлорамбуцил, винкристин, пентостатин, циклофосфамид, алемтузумаб (кампат-1H), доксорубин и преднизон. Биологическая терапия CLL включает антитела, например, алемтузумаб, ритуксимаб и офатумумаб; а также средства терапии на основе ингибиторов тирозинкиназы. Для классификации стадии CLL может быть использован целый ряд критериев, например, система Rai или Binet. В системе Rai описано, что CLL характеризуется наличием пяти стадий: стадия 0, при которой присутствует только лимфоцитоз; стадия I, при которой присутствует лимфаденопатия; стадия II, при которой присутствуют спленомегалия, лимфаденопатия или обе; стадия III, при которой присутствуют анемия, органомегалия или обе (прогрессирование определяется по потере веса, утомляемости, лихорадке, массивной органомегалии и быстро возрастающем количестве лимфоцитов); и стадия IV, при которой присутствуют анемия, тромбоцитопения, органомегалия или их комбинация. В соответствии с системой определения стадий по Binet существуют три категории: стадия A, при которой присутствует лимфоцитоз и увеличены менее трех лимфатических узлов (эта стадия включает всех пациентов со стадией 0 по Rai, половину пациентов со стадией I по Rai и треть пациентов со стадией II по Rai); стадия B, при которой вовлечены три или более лимфатических узла; и стадия C, при которой присутствуют анемия или тромбоцитопения или обе. Эти системы классификации можно комбинировать с измерениями мутации генов иммуноглобулинов для получения более точных характеристик течения заболевания. Наличие мутированных генов иммуноглобулинов коррелирует с улучшенным прогнозом.

В другом варианте осуществления CAR-экспрессирующие клетки по настоящему изобретению применяют для лечения форм рака или форм лейкоза, например, с помощью лейкозных стволовых клеток. Например, лейкозные стволовые клетки представляют собой лейкозные CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> клетки.

В настоящем изобретении предусмотрены, среди прочего, композиции и способы лечения рака. В одном аспекте рак представляет собой гематологический рак, включающий без ограничения одну или несколько форм острого лейкоза, в том числе без ограничения В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (BALL), например, BALL у детей и/или BALL у взрослых, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз (TALL), мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз (SLL), острый лимфобластный лейкоз (ALL); одну или несколько форм хронического лейкоза, в том числе без ограничения

хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); дополнительные формы гематологического рака или гематологические состояния, в том числе без ограничения лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT, лимфому из клеток маргинальной зоны, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмцитоподобных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и заболевание, ассоциированное с экспрессией CD22, в том числе без ограничения атипичные и/или не являющиеся классическими формы рака, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие CD22; и любую их комбинацию.

Клетки с CAR по настоящему изобретению можно вводить как отдельно, так и в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы подавления пролиферации или снижения численности популяции клеток, экспрессирующих CD22, при этом способы включают приведение популяции клеток, содержащей клетку, экспрессирующую CD22, в контакт с клеткой, экспрессирующей CAR по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей CD22. В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы подавления пролиферации или снижения численности популяции раковых клеток, экспрессирующих CD22, при этом способы включают приведение популяции раковых клеток, экспрессирующих CD22, в контакт с клеткой, экспрессирующей CAR по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей CD22. В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы подавления пролиферации или снижения численности популяции раковых клеток, экспрессирующих CD22, при этом способы включают приведение популяции раковых клеток, экспрессирующих CD22, в контакт с клеткой, экспрессирующей CAR по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей CD22. В определенных аспектах клетка, экспрессирующая CAR по настоящему изобретению, снижает количество, число, численность или процентную долю клеток и/или раковых клеток на по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% у субъекта с В-клеточным злокачественным новообразованием или другим раком, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD22, или у соответствующей животной модели по сравнению с отрицательным контролем. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы предупреждения,

лечения и/или контроля заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD22 (например, гематологического рака или атипичного рака, экспрессирующего CD22), при этом способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, клетки, экспрессирующей CAR по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей CD22. В одном аспекте субъект представляет собой человека. Неограничивающие примеры нарушений, ассоциированных с клетками, экспрессирующими CD22, включают аутоиммунные заболевания (например, волчанку, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, аутоиммунную гемолитическую анемию, истинную эритроцитарную аплазию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром Эванса, васкулит, буллезные кожные нарушения, сахарный диабет 1 типа, синдром Шегрена, энцефалит с антителами к NMDA-рецепторам и болезнь Девича, офтальмопатию Грейвса и аутоиммунный панкреатит), воспалительные заболевания (аллергию и астму), трансплантацию и раковые заболевания (такие как формы гематологического рака или атипичные формы рака, экспрессирующие CD22).

В настоящем изобретении также предусмотрены способы предупреждения, лечения и/или контроля заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD22, при этом способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, клетки, экспрессирующей CAR по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей CD22. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

В настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения рецидива рака, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD22, при этом способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, клетки, экспрессирующей CAR по настоящему изобретению, которая связывается с клеткой, экспрессирующей CD22. В одном аспекте способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки, экспрессирующей CAR, описанной в данном документе, которая связывается с клеткой, экспрессирующей CD22, в комбинации с эффективным количеством другого терапевтического средства.

В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CD22, экспрессирует CD19, CD123, FLT-3, ROR-1, CD79b, CD179b, CD79a, CD10, CD34 и/или CD20. В определенных вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CD22, экспрессирует CD19. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CD22, не экспрессирует CD19.

В некоторых вариантах осуществления субъект не демонстрирует ответ на терапию на основе CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует частичный ответ на терапию на основе CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует полный ответ на терапию на основе CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления субъект не демонстрирует рецидив заболевания при терапии на основе CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует частичный рецидив заболевания при терапии на основе CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления субъект демонстрирует

полный рецидив заболевания при терапии на основе CAR для CD19.

В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние, которые ранее демонстрировали ответ на лечение клетками, экспрессирующими CAR для CD19, не экспрессируют CD19. В некоторых вариантах осуществления для рака или другого состояния, которые ранее демонстрировали ответ на лечение клетками, экспрессирующими CAR для CD19, характерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или большее снижение уровней экспрессии CD19 по сравнению с тем, когда рак или другое состояние демонстрировали ответ на лечение клетками, экспрессирующими CAR для CD19. В некоторых вариантах осуществления рак или другое состояние, которые ранее демонстрировали ответ на лечение клетками, экспрессирующими CAR для CD19, экспрессируют CD22.

В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую CAR, по настоящему изобретению, вводят после рецидива рака или другого состояния, которое ранее лечили клеткой, экспрессирующей CAR для CD19.

Т-клетки CAR для CD19 для применения в лечении множественной миеломы

Даже при современных схемах химиотерапии, целенаправленно воздействующих видах терапии и трансплантации аутологичных стволовых клеток миелома считается неизлечимым заболеванием. В одном исследовании (не раскрыто) описано лечение множественной миеломы (ММ) аутологичными Т-клетками, направленными на CD19 с помощью химерного антигенного рецептора (лентивирус/CD19:4-1BB:CD3-дзета; также известными как "CART19" или CTL019). Данный пример демонстрирует, что CD19-направленные виды терапии на основе CAR обладают потенциалом для установления глубоких, долговременных надежных ремиссий за счет нацеливания на миеломные стволовые клетки и/или опухолевые клетки, которые экспрессируют CD19 на очень низких (не выявляемых большинством способов) уровнях.

Терапия на основе Т-клеток CAR19 для лимфомы Ходжкина

Терапия на основе Т-клеток CAR19 также может применяться для лечения лимфомы Ходжкина (HL). Лимфома Ходжкина характеризуется наличием злокачественных клеток Ходжкина-Рид-Штернберга (HRS), которые происходят из клональных В-клеток герминального центра. Имеется несколько факторов, которые указывают на терапевтическую эффективность терапии на основе Т-клеток CAR19 для HL. Окрашивание CD19 опухолей HL демонстрирует клетки, экспрессирующие CD19 (CD19<sup>+</sup>), в пределах опухоли и микроокружения опухоли. Исследование показало, что клональная популяция В-клеток (CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>ALDH<sup>+</sup>), которые экспрессируют CD19, отвечает за создание и поддержание линий клеток лимфомы Ходжкина, а также циркулирует в крови большинства пациентов с HL (Jones et al., Blood, 2009, 113(23):5920-5926). Было также высказано предположение, что эта популяция клональных В-клеток вызывает или способствует образованию злокачественных клеток HRS. Таким образом, терапия на основе CART19 будет истощать эту популяцию В-клеток, которая способствует онкогенезу или поддержанию опухолевых клеток. Другое исследование

показало, что истощение В-клеток замедляет рост солидных опухолей у нескольких мышиных моделей (Kim et al., J Immunotherapy, 2008, 31(5):446-57). В поддержку идеи о том, что истощение В-клеток в микроокружении опухоли НЛ приводит к некоторому противоопухолевому эффекту, современные виды терапии, такие как ритуксан, проходят клинические испытания в отношении нацеливания и истощения опухолевых В-клеток при НЛ (Younes et al., Blood, 2012, 119(18):4123-8). Также было показано, что канцерогенез de novo, связанный с хроническим воспалением, зависит от В-клеток (de Visser, et al., Cancer Cell, 2005, 7(5):411-23). Результаты этих исследований показывают, что нацеливание на популяцию В-клеток, в частности, в микроокружении опухоли НЛ, было бы применимым для лечения НЛ за счет снижения или ингибирования прогрессирования заболевания или роста опухоли.

Подгруппа пациентов, не отвечающих на лечение, среди пациентов с CLL проявляла повышенную экспрессию молекул ингибиторов контрольных точек иммунного ответа

В одном исследовании (данные не показаны) клетки CART19, полученные в результате клинического производства от 34 пациентов с CLL, оценивали в отношении экспрессии молекул ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, таких как PD-1, LAG3 и TIM3. Ответ этой когорты на CART19 был известен, и поэтому можно было оценивать корреляцию между ответом и паттернами экспрессии биомаркера.

Эффекты ингибирования mTOR в отношении "старения" иммунной системы у пожилых людей

Действие ингибирования mTOR в отношении "старения" иммунной системы описано, например, в примере 1 из международной заявки WO/2015/073644, и эта заявка полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Усиление иммунного ответа на вакцину у субъектов пожилого возраста

Действие ингибирования mTOR в отношении усиления иммунного ответа описано, например, в примере 2 из международной заявки WO/2015/073644, и эта заявка полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Ингибирование mTOR при низкой дозе усиливает энергию и физическую активность

Эффект ингибирования mTOR в отношении энергии и физической активности описан, например, в примере 3 из 20 международной заявки WO/2015/073644, и эта заявка полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Ингибирование киназы P70 S6 с помощью RAD001

Эффект ингибирования mTOR в отношении ингибирования киназы P70 S6 описан, например, в примере 4 из международной заявки WO/2015/073644, и эта заявка полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Экзогенный IL-7 усиливает функцию CAR-T-клеток

После адоптивного переноса CAR-T-клеток у некоторых пациентов сохраняется ограниченная персистенция CAR-T-клеток, что может привести к субоптимальным



уровням противоопухолевой активности. В данном примере эффекты от введения экзогенного IL-7 человека оценивали на ксенотрансплантатных мышинных моделях, у которых наблюдался первоначальный субоптимальный ответ на CAR-T-клетки.

#### Виды комбинированной терапии

Описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, можно применять в комбинации с другими известными средствами и видами терапии. Используемое в данном документе "вводимый в комбинации" означает, что два (или более) различных средства лечения доставляют субъекту во время периода, когда субъект страдает нарушением, например, два или более средства лечения доставляют после того, как у субъекта было диагностировано нарушение, и перед тем, как нарушение будет излечено или устранено или лечение будет прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго, так что имеет место перекрытие с точки зрения введения. Это иногда обозначается в данном документе как "одновременная" или "параллельная" доставка. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго средства лечения, или второе средство лечения снижает интенсивность симптомов в большей степени, чем наблюдалось бы при введении второго средства лечения в отсутствие первого средства лечения, или аналогичная ситуация наблюдается с первым средством лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка является такой, при которой снижение интенсивности симптома или другого параметра, связанного с нарушением, является более значительным, чем наблюдалось бы при доставке одного средства лечения в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или превышающим аддитивный. Доставка может быть такой, что эффект от первого доставленного средства для лечения все еще поддается выявлению при доставке второго.

Описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство можно вводить одновременно в одной и той же или отдельных композициях или последовательно. В случае последовательного введения описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, можно вводить первой, а дополнительное средство можно вводить вторым, или порядок введения может быть обратным.

Терапия на основе CAR и/или другие терапевтические средства, процедуры или способы можно применять во время периодов активного проявления нарушения или во время периода ремиссии или менее активного проявления заболевания. Терапию на основе CAR можно вводить перед другим средством лечения, параллельно со средством лечения, после средства лечения или во время ремиссии нарушения.

При введении в комбинации терапию на основе CAR и дополнительное средство (например, второе или третье средство) или все из них можно вводить в количестве или дозе, которые выше, ниже или такие же по сравнению с количеством или дозировкой каждого средства, используемого отдельно, например в качестве монотерапии. В определенных вариантах осуществления введенное количество или дозировка терапии на основе CAR, дополнительного средства (например, второго или третьего средства) или всех из них ниже (например, на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%), чем количество или дозировка каждого средства, используемого отдельно, например в качестве монотерапии. В некоторых вариантах осуществления количество или дозировка терапии на основе CAR, дополнительного средства (например, второго или третьего средства) или всех из них, которые приводят к требуемому эффекту (например, лечению рака), ниже (например, ниже на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%), чем количество или дозировка каждого средства, используемого отдельно, например в качестве монотерапии, необходимые для достижения того же терапевтического эффекта.

В дополнительных аспектах описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, можно применять в схеме лечения в комбинации с хирургическим вмешательством, цитокинами, облучением или химиотерапией, такой как цитоксан, флударабин, ингибиторы гистондеацетилазы, деметилирующие средства или пептидная вакцина, как описано в Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

В определенных случаях соединения по настоящему изобретению комбинируют с другими терапевтическими средствами, такими как другие противораковые средства, противоаллергические средства, средства против тошноты (или противорвотные средства), обезболивающие средства, цитопротекторные средства и их комбинации.

Основные химиотерапевтические средства, рассматриваемые для применения в видах комбинированной терапии, включают анастрозол (Arimidex®), бикалутамид (Casodex®), блеомицина сульфат (Blenoxane®), бусульфан (Myleran®), бусульфан для инъекций (Busulfex®), капецитабин (Xeloda®), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксидеозид-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Leukeran®), цисплатин (Platinol®), кладрибин (Leustatin®), циклофосфамид (Cytosan® или Neosar®), цитарабин, цитозинарабинозид (Cytosar-U®), липосомный цитарабин для инъекций (DepoCyt®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (актиномицин D, Cosmegen), даунорубицина гидрохлорид (Cerubidine®), липосомный даунорубицина цитрат для инъекций (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere®), доксорубицина гидрохлорид (Adriamycin®, Rubex®), этопозид (Vepesid®), флударабина фосфат (Fludara®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®), флутамид (Eulexin®), тезацитибин, гемцитабин (дифтордезоксидеозид), гидроксимочевина (Hydrea®), идарубицин (Idamycin®), ифосфамид (IFEX®), иринотекан (Campptosar®), L-аспарагиназу (ELSPAR®), лейковорин кальция, мелфалан (Alkeran®), 6-меркаптопурин (Purinethol®), метотрексат (Folex®), митоксантрон (Novantrone®), милотарг, паклитаксел (Taxol®), наб-паклитаксел

(Abraxane®), феникс (иттрий-90/MX-DTPA), пентостатин, полифепрозан 20 с кармустином для имплантации (Gliadel®), цитрат тамоксифена (Nolvadex®), тенипозид (Vumon®), 6-тиогуанин, тиотепу, тирапазамин (Tirazone®), топотекана гидрохлорид для инъекций (Hycamptin®), винбластин (Velban®), винкристин (Oncovin®) и винорелбин (Navelbine®).

Противораковые средства, представляющие особый интерес для комбинаций с соединениями по настоящему изобретению, включают: противоопухолевые антибиотики; ингибиторы тирозинкиназы; алкилирующие средства; антимицротубулиновые или антимитотические средства или онколитические вирусы.

Типичные ингибиторы тирозинкиназы включают без ограничения эрлотиниба гидрохлорид (Tarceva®); линифаниб (N-[4-(3-амино-1H-индазол-4-ил)фенил]-N'-(2-фтор-5-метилфенил)мочевина, также известный как АВТ 869, доступен от Genentech); сунитиниба малат (Sutent®); босутиниб (4-[(2,4-дихлор-5-метоксифенил)амино]-6-метокси-7-[3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропокси]хинолин-3-карбонитрил, также известный как SKI-606 и описанный в патенте США № 6780996); дазатиниб (Sprycel®); пазопаниб (Votrient®); сорафениб (Nexavar®); зактому (ZD6474) и иматиниб или иматиниба мезилат (Gilevec® и Gleevec®).

Иллюстративные алкилирующие средства включают без ограничения оксалиплатин (Eloxatin®); темозоломид (Temodar® и Temodal®); дактиномицин (также известный как актиномицин-D, Cosmegen®); мелфалан (также известный как L-PAM, L-сарколизин и фенилаланиновый иприт, Alkeran®); алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Hexalen®); кармустин (BiCNU®); бендамустин (Treanda®); бусульфан (Busulfex® и Myleran®); карбоплатин (Paraplatin®); ломустин (также известный как CCNU, SeeNU®); цисплатин (также известный как CDDP, Platinol® и Platinol®-AQ); хлорамбуцил (Leukeran®); циклофосфамид (Cytosan® и Neosar®); дакарбазин (также известный как DTIC, DIC и имидазолкарбоксамид, DTIC-Dome®); алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Hexalen®); ифосфамид (Ifex®); преднумустин; прокарбазин (Matulane®); мехлорэтамин (также известный как азотистый иприт, мустин и гидрохлорид мехлорэтамину, Mustargen®); стрептозоцин (Zanosar®); тиотепу (также известную как тиофосфоамид, TESPА и TSPA, Thioplex®); циклофосфамид (Endoxan®, Cytosan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®) и бендамустин HCl (Treanda®).

Иллюстративные противоопухолевые антибиотики включают, например, доксорубин (Adriamycin® и Rubex®); блеомицин (Ienoxane®); даунорубин (даунорубин гидрохлорид, дауномицин и рубидомицин гидрохлорид, Cerubidine®); липосомный даунорубин (липосомный даунорубин цитрат, DaunoXome®); митоксантрон (DHAD, Novantrone®); эпирубин (Ellence™); идарубин (Idamycin®, Idamycin PFS®); митомицин С (Mutamycin®); гелданамицин; гербимицин; равидомицин и дезацетилравидомицин.

Типичные антимицротубулиновые или антимитотические средства включают без

ограничения алкалоиды барвинка (такие как винорелбина тартрат (Navelbine®), винкристин (Oncovin®) и виндезин (Eldisine®)); таксаны (такие как паклитаксел и доцетаксел); а также эстрамустин (Emcy1® или Estracyt®).

В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую клетку CAR, вводят в комбинации с онколитическим вирусом. В ряде вариантов осуществления онколитические вирусы способны избирательно реплицироваться в раковой клетке и запускать ее гибель или замедлять ее рост. В некоторых случаях онколитические вирусы не обеспечивают эффект или обеспечивают минимальный эффект в отношении нераковых клеток. Онколитический вирус включает без ограничения онколитический аденовирус, онколитические вирусы простого герпеса, онколитический ретровирус, онколитический парвовирус, онколитический вирус осповакцины, онколитический вирус Синбис, онколитический вирус гриппа или онколитический РНК-содержащий вирус (например, онколитический реовирус, онколитический вирус ньюкаслской болезни (NDV), онколитический вирус кори или онколитический вирус везикулярного стоматита (VSV)).

В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой вирус, например, рекомбинантный онколитический вирус, описанный в US2010/0178684 A1, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный онколитический вирус содержит последовательность нуклеиновой кислоты (например, гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты), кодирующую ингибитор иммунного или воспалительного ответа, например, описанную в US2010/0178684 A1, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный онколитический вирус, например, онколитический вирус NDV, содержит проапоптотический белок (например, апоптин), цитокин (например, GM-CSF, интерферон-гамма, интерлейкин 2 (IL-2), фактор некроза опухоли альфа), иммуноглобулин (например, антитело к фибронектину ED-B), опухолеассоциированный антиген, биспецифический адапторный белок (например, биспецифическое антитело или фрагмент антитела, направленные против белка HN NDV, T-клеточный костимуляторный рецептор, такой как CD3 или CD28; или слитый белок на основе IL-2 человека и одноцепочечного антитела, направленного против белка HN NDV). См., например, Zamarin et al. *Future Microbiol.* 7.3(2012):347-67, включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой химерный онколитический NDV, описанный в US 8591881 B2, US 2012/0122185 A1 или US 2014/0271677 A1, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус включает условно-репликативный аденовирус (CRAd), который разработан для репликации исключительно в раковых клетках. См., например, Alemany et al. *Nature Biotechnol.* 18(2000):723-27. В некоторых вариантах осуществления онколитический аденовирус представляет собой

таковой, описанный в таблице 1 на странице 725 в Alemany et al., включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Иллюстративные онколитические вирусы включают без ограничения следующие:

онколитический аденовирус группы В (ColoAd1) (PsiOxus Therapeutics Ltd.) (см., например, клиническое испытание с идентификационным номером NCT02053220);

ONCOS-102 (ранее называемый CGTG-102), который представляет собой аденовирус, содержащий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (Oncos Therapeutics) (см., например, клиническое испытание с идентификационным номером NCT01598129);

VCN-01, который представляет собой генетически модифицированный онколитический аденовирус человека, кодирующий гиалуронидазу PH20 человека (VCN Biosciences, S.L.) (см., например, клинические испытание с идентификационными номерами NCT02045602 и NCT02045589);

условно-репликативный аденовирус ICOVIR-5, который представляет собой вирус, полученный из аденовируса человека дикого типа серотипа 5 (HAd5), который был модифицирован для избирательной репликации в раковых клетках с нарушенной регуляцией сигнального пути белок ретинобластомы/E2F (Каталонский институт онкологии) (см., например, клиническое испытание с идентификационным номером NCT01864759);

Celyvir, который содержит аутологичные мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга (MSC), инфицированные ICOVIR5, онколитический аденовирус (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Мадрид, Испания/Ramon Alemany) (см., например, клиническое испытание с идентификационным номером NCT01844661);

CG0070, который представляет собой условно-репликативный онколитический аденовирус серотипа 5 (Ad5), в котором промотор E2F-1 человека регулирует экспрессию важного гена вируса E1a, за счет чего обеспечивается ограничение вирусной репликации и цитотоксичности в дефектных в отношении Rb-пути опухолевых клетках (Cold Genesys, Inc.) (см., например, клиническое исследование с идентификационным номером NCT02143804); или

DNX-2401 (ранее называемый дельта-24-RGD), который представляет собой аденовирус, который был сконструирован для избирательной репликации в дефектных в отношении пути ретинобластомы (Rb) клетках и для более эффективного инфицирования клеток, которые экспрессируют определенные связывающиеся с RGD интегрины (Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNAtrix, Inc.) (см., например, клиническое испытание с идентификационным номером NCT01956734).

В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус, описанный в данном документе, вводят с помощью инъекции, например, подкожной, внутриартериальной, внутривенной, внутримышечной, интратекальной или внутрибрюшинной инъекций. В вариантах осуществления онколитический вирус, описанный в данном документе, вводят интратуморально, трансдермально,

трансмукозально, перорально, интраназально или посредством ингаляционного введения.

В одном варианте осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, вводят субъекту в комбинации с молекулой, нацеливающейся на GITR и/или модулирующей функции GITR, например, агонистом GITR и/или антителом к GITR, которое истощает регуляторные Т-клетки (Treg). В одном варианте осуществления молекулы, связывающие GITR, и/или молекулы, модулирующие функции GITR (например, агонист GITR и/или истощающие Treg антитела к GITR), вводят до введения клетки, экспрессирующей CAR. Например, в одном варианте осуществления агонист GITR можно вводить до афереза клеток. В одном варианте осуществления у субъекта имеется CLL. Иллюстративные агонисты GITR включают, например, слитые белки GITR и антитела к GITR (например, бивалентные антитела к GITR), такие как, например, слитый белок GITR, описанный в патенте США № 6111090, европейском патенте № 090505B1, патенте США № 8586023, публикациях согласно PCT №№ WO 2010/003118 и 2011/090754, или антитело к GITR описанное, например, в патенте США № 7025962, европейском патенте № 1947183B1, патенте США № 7812135, патенте США № 8388967, патенте США № 8591886, европейском патенте № EP 1866339, публикации согласно PCT № WO 2011/028683, публикации согласно PCT № WO 2013/039954, публикации согласно PCT № WO 2005/007190, публикации согласно PCT № WO 2007/133822, публикации согласно PCT № WO 2005/055808, публикации согласно PCT № WO 99/40196, публикации согласно PCT № WO 2001/03720, публикации согласно PCT № WO 99/20758, публикации согласно PCT № WO 2006/083289, публикации согласно PCT № WO 2005/115451, патенте США № 7618632 и публикации согласно PCT № WO 2011/051726.

В одном варианте осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, вводят субъекту в комбинации с ингибитором mTOR, например, ингибитором mTOR, описанным в данном документе, например, рапалогом, таким как эверолимус. В одном варианте осуществления ингибитор mTOR вводят до введения клетки, экспрессирующей CAR. Например, в одном варианте осуществления ингибитор mTOR можно вводить до афереза клеток.

В одном варианте осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую CAR, вводят субъекту в комбинации с агонистом GITR, например, агонистом GITR, описанным в данном документе. В одном варианте осуществления агонист GITR вводят до введения клетки, экспрессирующей CAR. Например, в одном варианте осуществления агонист GITR можно вводить до афереза клеток.

В одном варианте осуществления описанную в данном документе клетку, экспрессирующую клетку CAR, вводят субъекту в комбинации с ингибитором протеинтирозинфосфатазы, например, ингибитором протеинтирозинфосфатазы, описанным в данном документе. В одном варианте осуществления ингибитор протеинтирозинфосфатазы представляет собой ингибитор SHP-1, например, ингибитор SHP-1, описанный в данном документе, такой как, например, стибоглюконат натрия. В одном варианте осуществления ингибитор протеинтирозинфосфатазы представляет собой

ингибитор SHP-2.

В одном варианте осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, может применяться в комбинации с ингибитором киназы.

В варианте осуществления данный подход может применяться у субъекта для оптимизации функциональных характеристик клеток с CAR, описанных в данном документе. Без ограничения какой-либо теорией, полагают, что в одном варианте осуществления функциональные характеристики эндогенных, немодифицированных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, улучшаются. Не ограничиваясь теорией, полагают, что в варианте осуществления функциональные характеристики клетки, экспрессирующей CAR, улучшаются. В некоторых вариантах осуществления клетки, например Т-клетки или NK-клетки, которые были сконструированы или будут сконструированы для экспрессии CAR, могут быть обработаны *ex vivo* путем приведения в контакт с количеством ингибитора mTOR, которое повышает число PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например Т-клеток/NK-клеток, или повышает отношение PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, к PD1-положительным иммунным эффекторным клеткам, например, Т-клеткам или NK клеткам.

В варианте осуществления введение низкой дозы, усиливающей иммунный ответ, ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора, например, RAD001, или каталитического ингибитора, начинают до введения описанной в данном документе клетки, экспрессирующей CAR, например, Т-клеток или NK-клеток. В варианте осуществления клетки с CAR вводят спустя достаточное время или после введения достаточной дозы ингибитора mTOR, чтобы уровень PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток/NK-клеток, или отношение PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток/NK-клеток, к PD1-положительным иммунным эффекторным клеткам, например, Т-клеткам/NK-клеткам, по меньшей мере временно были повышенными.

В варианте осуществления клетку, например, Т-клетку или NK-клетку, подлежащую конструированию для экспрессии CAR, собирают спустя достаточное время или после введения достаточной низкой дозы, усиливающей иммунный ответ, ингибитора mTOR, чтобы уровень PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, или отношение PD1-отрицательных иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, к PD1-положительным иммунным эффекторным клеткам, например, Т-клеткам или NK-клеткам, имеющимся у субъекта или собранным от субъекта, по меньшей мере временно были повышенными.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят в течение времени, достаточного для снижения доли PD-1-положительных Т-клеток, повышения доли PD-1-отрицательных Т-клеток или повышения отношения PD-1-отрицательные Т-клеток/PD-1-положительные Т-клетки в периферической крови субъекта или в препарате Т-клеток, выделенных из субъекта.

В некоторых вариантах осуществления доза ингибитора mTOR связана с ингибитором mTOR по меньшей мере на 5, но не более чем на 90%, например, как измерено с помощью ингибирования p70 S6K. В некоторых вариантах осуществления доза ингибитора mTOR связана с ингибированием mTOR по меньшей мере на 10%, но не более чем на 40%, например, как измерено с помощью ингибирования p70 S6K.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, например, ингибитор CDK4, описанный в данной документе, например ингибитор CD4/6, такой как 6-ацетил-8-циклопентил-5-метил-2-(5-пиперазин-1-илпиримидин-2-иламино)-8H-пиридо[2,3-d]пиримидин-7-она гидрохлорид (также называемый палбоциклиб или PD0332991). В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор ВТК, например, ингибитор ВТК, описанный в данном документе, такой как, например, ибрутиниб. В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, ингибитор mTOR, описанный в данном документе, такой как, например, рапамицин, аналог рапамицина, OSI-027. Ингибитор mTOR может представлять собой, например, ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2, например, ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2, описанные в данной документе. В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK, например, ингибитор MNK, описанный в данном документе, такой как, например, 4-амино-5-(4-фторанилино)пиразоло[3,4-d]пиримидин. Ингибитор MNK может представлять собой, например, ингибитор MNK1a, MNK1b, MNK2a и/или MNK2b. В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор DGK, например, ингибитор DGK, описанный в данном документе, такой как, например, DGKinh1 (D5919) или DGKinh2 (D5794). В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, выбранный из алоизина А; флавопиридола или HMR-1275, 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(3S,4R)-3-гидрокси-1-метил-4-пиперидинил]-4-хроменона; кризотиниба (PF-02341066; 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(2R,3S)-2-(гидроксиметил)-1-метил-3-пирролидинил]-4H-1-бензопиран-4-она гидрохлорида (P276-00); 1-метил-5-[[2-[5-(трифторметил)-1H-имидазол-2-ил]-4-пиридинил]окси]-N-[4-(трифторметил)фенил]-1H-бензиамидазол-2-амин (RAF265); индисулама (E7070); росковитина (CYC202); палбоциклиба (PD0332991); динациклиба (SCH727965); N-[5-[[5-*трет*-бутилоксазол-2-ил)метил]тио]тиазол-2-ил]пиперидин-4-карбоксамид (BMS 387032); 4-[[9-хлор-7-(2,6-дифторфенил)-5H-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил]амино]бензойной кислоты (MLN8054); 5-[3-(4,6-дифтор-1H-бензиамидазол-2-ил)-1H-индазол-5-ил]-N-этил-4-метил-3-пиридинметанамина (AG-024322); 4-(2,6-дихлорбензоиламино)-1H-пиразол-3-карбоновой кислоты N-(пиперидин-4-ил)амида (AT7519); 4-[2-метил-1-(1-метилэтил)-1H-имидазол-5-ил]-N-[4-(метилсульфонил)фенил]-2-пиримидинамина (AZD5438) и XL281 (BMS908662).

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, например, палбоциклиб (PD0332991), и палбоциклиб вводят в дозе, составляющей приблизительно 50 мг, 60 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 105 мг, 110 мг, 115 мг, 120



мг, 125 мг, 130 мг, 135 мг (например, 75 мг, 100 мг или 125 мг) ежедневно в течение периода времени, например, ежедневно в течение 14-21 дня из 28-дневного цикла или в течение 7-12 дней из 21-дневного цикла. В одном варианте осуществления вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов палбоциклиба.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор ВТК, выбранный из ибрутиниба (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; NM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774 и LFM-A13.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор ВТК, например, ибрутиниб (PCI-32765), и ибрутиниб вводят в дозе, составляющей приблизительно 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 420 мг, 440 мг, 460 мг, 480 мг, 500 мг, 520 мг, 540 мг, 560 мг, 580 мг, 600 мг (например, 250 мг, 420 мг или 560 мг) ежедневно в течение периода времени, например, ежедневно в течение 21-дневного цикла или ежедневно в течение 28-дневного цикла. В одном варианте осуществления вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов ибрутиниба.

В одном варианте осуществления ингибитором киназы является ингибитор mTOR, выбранный из темсиролимуса; ридафоролимуса (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R, 23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30,3,1.0<sup>4,9</sup>]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексил-диметилфосфината, также известного как AP23573 и MK8669; эверолимуса (RAD001); рапамицина (AY22989); симапимода; (5-{2,4-бис[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанола (AZD8055); 2-амино-8-[*транс*-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метил-пиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-она (PF04691502); N<sup>2</sup>-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4H-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицил-L-α-аспартил-серин-, внутренней соли (SF1126) и XL765.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, рапамицин, и рапамицин вводят в дозе, составляющей приблизительно 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг (например, 6 мг) ежедневно в течение периода времени, например, ежедневно в течение 21-дневного цикла или ежедневно в течение 28-дневного цикла. В одном варианте осуществления вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов рапамицина. В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, эверолимус, и эверолимус вводят в дозе, составляющей приблизительно 2 мг, 2,5 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг (например, 10 мг), ежедневно в течение определенного периода времени, например, ежедневно в течение 28-дневного цикла. В одном варианте осуществления вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов эверолимуса.

В одном варианте осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK, выбранный из CGP052088; 4-амино-3-(п-фторфениламино)пиразоло[3,4-d]пиримидина (CGP57380); церкоспорамида; ETC-1780445-2 и 4-амино-5-(4-

фторанилино)пиразоло[3,4-d]пиримидина.

Также могут применяться лекарственные средства, которые ингибируют как кальцийзависимую фосфатазу кальцинейрин (циклоспорин и FK506), так и киназу p70S6, которая является важной для передачи сигнала, индуцированной фактором роста (рапамицин). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). В дополнительном аспекте композиции на основе клеток по настоящему изобретению можно вводить пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга, Т-клеточной абляционной терапией с помощью химиотерапевтических средств, таких как флударабин, наружной дистанционной лучевой терапией (ХРТ), циклофосфамидом и/или антителами, такими как ОКТ3 или САМРАТН. В одном аспекте композиции на основе клеток по настоящему изобретению вводят после В-клеточной абляционной терапии, такой как средства, которые действуют на CD20, например, ритуксан. Например, в одном варианте осуществления субъекты могут подвергаться стандартному лечению посредством высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантата субъекты получают инфузию размноженных иммунных клеток по настоящему изобретению. В дополнительном варианте осуществления размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

Некоторые пациенты могут испытывать аллергические реакции на соединения по настоящему изобретению и/или другое(-ие) противораковое(-ые) средство(-а) во время или после введения; в связи с этим для сведения риска аллергической реакции к минимуму часто вводят противоаллергические средства. Подходящие противоаллергические средства включают кортикостероиды, такие как дексаметазон (например, Decadron®), беклометазон (например, Veclovent®), гидрокортизон (также известный как кортизон, гидрокортизона сукцинат натрия, гидрокортизона фосфат натрия, и продаваемый под торговыми марками Ala-Cort®, гидрокортизонфосфат, Solu-Cortef®, Hydrocort Acetate® и Lanacort®), преднизолон (продаваемый под торговыми марками Delta-Cortel®, Orapred®, PEDIAPRED® и Prelone®), преднизон (продаваемый под торговыми марками Deltasone®, Liquid Red®, Meticorten® и Orasone®), метилпреднизолон (также известный как 6-метилпреднизолон, метилпреднизолон ацетат, метилпреднизолон сукцинат натрия, продаваемый под торговыми марками Duralone®, Medralone®, Medrol®, M-Prednisol® и Solu-Medrol®); антигистаминные средства, такие как дифенгидрамин (например, Benadryl®), гидроксизин и ципрогептадин; и бронхолитические средства, такие как агонисты бета-адренергического рецептора, альбутерол (например, Proventil®) и тербуталин (Brethine®).

Некоторые пациенты могут испытывать тошноту во время и после введения соединения по настоящему изобретению и/или другого(-их) противоракового(-ых) средства(средств); в связи с этим для предупреждения тошноты (верхняя часть желудка) и рвоты применяют противорвотные средства. Пригодные противорвотные средства

включают апрепитант (Emend®), ондансетрон (Zofran®), гранисетрон HCl (Kytril®), лоразепам (Ativan®), дексаметазон (Decadron®), прохлорперазин (Compazine®), казопитант (Rezonic® и Zunriga®) и их комбинации.

Лекарственные препараты для облегчения боли, испытываемой в период лечения, часто прописывают для облегчения состояния пациента. Часто используют обычные отпускаемые без рецепта анальгетики, такие как Tylenol®. Однако при умеренной или сильной боли пригодны также опиоидные анальгезирующие лекарственные средства, такие как гидрокодон/парацетамол или гидрокодон/ацетаминофен (например, Vicodin®), морфин (например, Astramorph® или Avinza®), оксикодон (например, OxyContin® или Percocet®), оксиморфона гидрохлорид (Opana®) и фентанил (например, Duragesic®).

С целью защиты нормальных клеток от токсичности, обусловленной лечением, и ограничения токсичности по отношению к органам, в качестве вспомогательной терапии можно использовать цитопротекторные средства (такие как нейропротекторы, поглотители свободных радикалов, кардиопротекторы, нейтрализаторы антрациклина, вызывающего кровоизлияния, питательные вещества и т. п.). Подходящие цитопротекторные средства включают амифостин (Ethyol®), глутамин, димесну (Tavocept®), месну (Mesnex®), дексразоксан (Zinecard® или Totect®), ксалипроден (Xarfigo®) и лейковорин (также известный как лейковорин кальция, цитроворум-фактор и фолиновая кислота).

Структура активных соединений, определяемая кодовыми номерами, тривиальными названиями или торговыми марками, может быть взята из актуального издания стандартного сборника "The Merck Index" или из баз данных, например, Patents International (например, IMS World Publications).

Вышеупомянутые соединения, которые могут применяться в комбинации с соединением по настоящему изобретению, могут быть получены и введены, как описано в данной области техники, например, в документах, упомянутых выше.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно соединение по настоящему изобретению (например, соединение по настоящему изобретению) или его фармацевтически приемлемую соль совместно с фармацевтически приемлемым носителем, подходящим для введения субъекту-человеку или субъекту-животному либо отдельно, либо совместно с другими противораковыми средствами.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъектов-людей или субъектов-животных, страдающих клеточным пролиферативным заболеванием, таким как рак. В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъекта-человека или субъекта-животного, нуждающихся в таком лечении, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по настоящему изобретению (например, соединения по настоящему изобретению) или его фармацевтически приемлемой соли либо отдельно, либо в комбинации с другими противораковыми средствами.

В частности, композиции будут либо составлять вместе в виде комбинированного терапевтического средства, либо вводить отдельно.

При комбинированной терапии соединение по настоящему изобретению и другое(-ие) противораковое(-ые) средство(-а) можно вводить одновременно, параллельно или последовательно без конкретных ограничений по времени, при этом такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента.

В предпочтительном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению и другое(-ие) противораковое(-ые) средство(-а) обычно вводят последовательно в любом порядке с помощью инфузии или перорально. Схема введения доз может меняться в зависимости от стадии заболевания, физического состояния пациента, профилей безопасности отдельных лекарственных средств и переносимости отдельных лекарственных средств, а также от других критериев, хорошо известных лечащему врачу и медицинскому(-им) работнику(-ам), вводящему(-им) эту комбинацию. Соединение по настоящему изобретению и другое(-ие) противораковое(-ые) средство(-а) можно вводить в пределах минут друг от друга, с интервалом, составляющим часы, дни или даже недели, в зависимости от определенного цикла, используемого для лечения. Кроме того, цикл может включать более частое введение одного лекарственного средства по сравнению с другим в ходе цикла лечения и в различных дозах на одно введение лекарственного средства.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены наборы, которые включают одно или несколько соединений по настоящему изобретению и партнера по комбинации, раскрытого в данном документе. Иллюстративные наборы включают (а) соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, (б) по меньшей мере одного партнера по комбинации, например, указанного выше, при этом такой набор может содержать листок-вкладыш или другую этикетку, содержащую инструкции по введению.

Соединение по настоящему изобретению также можно применять для обеспечения преимущества в комбинации с известными терапевтическими процессами, например, введением гормонов или, в частности, облучением. Соединение по настоящему изобретению, в частности, можно применять в качестве радиосенсибилизатора, в частности, для лечения опухолей, которые характеризуются слабой чувствительностью к лучевой терапии.

В одном варианте осуществления субъекту можно вводить средство, которое ослабляет или уменьшает тяжесть побочного эффекта, ассоциированного с введением клетки, экспрессирующей CAR. Побочные эффекты, ассоциированные с введением клетки, экспрессирующей CAR, включают без ограничения CRS и гематологический лимфогистиоцитоз (HLH), также называемый синдромом активации макрофагов (MAS). Симптомы CRS включают высокую температуру, тошноту, преходящую гипотензию, гипоксию и т. п. CRS может включать клинические системные признаки и симптомы,

такие как лихорадка, утомляемость, анорексия, виды миалгии, виды артралгии, тошнота, рвота и головная боль. CRS может включать клинические признаки и симптомы со стороны кожи, такие как сыпь. CRS может включать клинические признаки и симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта, такие как тошнота, рвота и диарея. CRS может включать клинические признаки и симптомы со стороны дыхательной системы, такие как тахипноэ и гипоксемия. CRS может включать клинические признаки и симптомы со стороны сердечно-сосудистой системы, такие как тахикардия, "расширенное" пульсовое давление, гипотензия, повышенный сердечный выброс (ранний) и потенциально сниженный сердечный выброс (поздний). CRS может включать признаки и симптомы клинического свертывания крови, такие как повышенное содержание d-димера, гипофибриногенемия с кровотечением и без такового. CRS может включать клинические признаки и симптомы со стороны почек, такие как азотемия. CRS может включать клинические признаки и симптомы со стороны печени, такие как трансаминит и гипербилирубинемия. CRS может включать клинические признаки и симптомы со стороны нервной системы, такие как головная боль, изменения психического состояния, спутанность, делирий, затруднения с подбором слов или явная афазия, галлюцинации, тремор, дисметрия, нарушение походки и судороги. Соответственно, способы, описанные в данном документе, могут включать введение субъекту описанной в данном документе клетки, экспрессирующей CAR, и дополнительное введение одного или нескольких средств для контроля повышения уровней растворимого фактора, образующегося в результате лечения клеткой, экспрессирующей CAR. В одном варианте осуществления растворимый фактор, уровень которого повышен у субъекта, представляет собой одно или несколько из  $IFN-\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-2$  и  $IL-6$ . В одном варианте осуществления фактор, уровень которого повышен у субъекта, представляет собой одно или несколько из  $IL-1$ , GM-CSF,  $IL-10$ ,  $IL-8$ ,  $IL-5$  и факталькина. Таким образом, средство, вводимое для лечения этого побочного эффекта, может представлять собой средство, которое нейтрализует один или несколько из этих растворимых факторов. В одном варианте осуществления средство, которое нейтрализует одну или несколько из этих растворимых форм, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Примеры таких средств включают без ограничения стероид (например, кортикостероид), ингибитор  $TNF\alpha$  и ингибитор  $IL-6$ . Примером ингибитора  $TNF\alpha$  является молекула антитела к  $TNF\alpha$ , такая как инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол и голимумаб. Другим примером ингибитора  $TNF\alpha$  является слитый белок, такой как этанерцепт. Низкомолекулярный ингибитор  $TNF\alpha$  включает без ограничения производные ксантина (например, пентоксифиллин) и бупропион. Примером ингибитора  $IL-6$  является молекула антитела к  $IL-6$ , такая как тоцилизумаб (toc), сарилумаб, элсалимомаб, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301 и FM101. В одном варианте осуществления молекула антитела к  $IL-6$  представляет собой тоцилизумаб. Примером ингибитора  $IL-1R$  является анакинра.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят кортикостероид, такой как,

например, среди прочего, метилпреднизолон, гидрокортизон.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят сосудосуживающее средство, такое как, например, норэпинефрин, дофамин, фенилэфрин, эпинефрин, вазопрессин или их комбинацию.

В варианте осуществления субъекту могут вводить жаропонижающее средство. В варианте осуществления субъекту могут вводить анальгезирующее средство.

В одном варианте осуществления субъекту можно вводить средство, которое усиливает активность клетки, экспрессирующей CAR. Например, в одном варианте осуществления средство может представлять собой средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, белок запрограммированной смерти 1 (PD1), в некоторых вариантах осуществления могут снижать способность клетки, экспрессирующей CAR, вызывать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGF-бета. Ингибирование ингибирующей молекулы, например, за счет ингибирования на уровне ДНК, РНК или белка, может оптимизировать функциональные характеристики клетки, экспрессирующей CAR. В вариантах осуществления для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы в клетке, экспрессирующей CAR, можно применять ингибирующую нуклеиновую кислоту, например ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, dsRNA, например, siRNA или shRNA, или короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или эндонуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN). В варианте осуществления ингибитор представляет собой shRNA. В варианте осуществления ингибирующая молекула ингибируется в пределах клетки, экспрессирующей CAR. В этих вариантах осуществления молекула dsRNA, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, связана с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR. В одном варианте осуществления ингибитором ингибирующего сигнала может быть, например, антитело или фрагмент антитела, которые связываются с ингибирующей молекулой. Например, средство может представлять собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (например, ипилимумаб (также обозначаемый как MDX-010 и MDX-101, и доступный на рынке как Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; тремелиумаб (моноклональное IgG2-антитело, доступное от Pfizer, ранее известное как тицилиумаб, CP-675,206)). В одном варианте осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с TIM3. В одном варианте осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с LAG3. В варианте осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5).

PD1 является ингибирующим представителем семейства рецепторов CD28, которое

также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. 1996 *Int. Immunol* 8:765-75). Было показано, что два лиганда PD1, PD-L1 и PD-L2, при связывании с PD1 подавляют активацию Т-клеток (Freeman et al. 2000 *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman et al. 2001 *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al. 2002 *Eur J Immunol* 32:634-43). PD-L1 является широко распространенным при различных формах рака у человека (Dong et al. 2003 *J Mol Med* 81:281-7; Blank et al. 2005 *Cancer Immunol. Immunother* 54:307-314; Konishi et al. 2004 *Clin Cancer Res* 10:5094). Подавление иммунитета можно устранить путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1. Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы PD1, PD-L1 и PD-L2 доступны в данной области техники и могут применяться в комбинации с CAR, описанным в данном документе. Например, ниволумаб (также называемый BMS-936558 или MDX1106; Bristol-Myers Squibb) представляет собой полностью человеческое моноклональное IgG4-антитело, которое специфически блокирует PD1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD1, раскрыты в US 8008449 и WO2006/121168. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное моноклональное IgG1k-антитело, которое связывается с PD1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела к PD1 раскрыты в WO2009/101611. Пембролизумаб (ранее известный как ламбролизумаб и также называемый кейтруда, MK03475; Merck) представляет собой гуманизированное моноклональное IgG4-антитело, которое связывается с PD1. Пембролизумаб и другие гуманизированные антитела к PD-1 раскрыты в US 8354509 и WO2009/114335. MEDI4736 (Medimmune) представляет собой человеческое моноклональное антитело, которое связывается с PDL1 и ингибирует взаимодействие лиганда с PD1. MDPL3280A (Genentech/Roche) представляет собой человеческое Fc-оптимизированное моноклональное IgG1-антитело, которое связывается с PD-L1. MDPL3280A и другие моноклональные антитела человека к PD-L1 раскрыты в патенте США № 7943743 и публикации США № 20120039906. Другие средства, связывающие PD-L1, включают YW243.55.S70 (вариабельные области тяжелой и легкой цепей показаны в SEQ ID NO: 20 и 21 в WO2010/077634) и MDX-1105 (также называемое как BMS-936559, и, например, средства, связывающие PD-L1, раскрыты в WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; например, раскрытый в WO2010/027827 и WO2011/066342), представляет собой растворимый рецептор на основе продукта слияния PD-L2 и Fc, который блокирует взаимодействие между PD1 и B7-H1. Другие антитела к PD1 включают, среди прочего, AMP 514 (Amplimmune), например, антитела к PD1, описанные в US 8609089, US 2010028330 и/или US 20120114649.

TIM3 (Т-клеточный иммуноглобулин 3) также отрицательно регулирует Т-клеточную функцию, в частности, в секретирующих IFN- $\gamma$  хелперных CD4<sup>+</sup> Т-клетках 1 и цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клетках 1, и играет основную роль в истощении Т-клеток. Ингибирование взаимодействия между TIM3 и его лигандами, например, галектином-9 (Gal9), фосфатидилсерином (PS) и HMGB1, может повышать иммунный ответ. Антитела,

фрагменты антител и другие ингибиторы TIM3 и его лигандов, доступны в данной области техники и могут применяться в комбинации с CAR, например, описанным в данном документе. Например, антитела, фрагменты антител, низкомолекулярные соединения или пептидные ингибиторы, которые нацеливаются на TIM3, связываются с доменом IgV в TIM3 для ингибирования взаимодействия с его лигандами. Антитела и пептиды, которые ингибируют TIM3, раскрыты в WO2013/006490 и US20100247521. Другие антитела к TIM3 включают гуманизированные варианты RMT3-23 (раскрыты в Ngiow et al., 2011, *Cancer Res*, 71:3540-3551) и клон 8B.2C12 (раскрытый в Monney et al., 2002, *Nature*, 415:536-541). Биспецифические антитела, которые ингибируют TIM3 и PD-1, раскрыты в US20130156774.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое усиливает активность клетки, экспрессирующей CAR, представляет собой ингибитор CEACAM (например, ингибитор CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5). В одном варианте осуществления ингибитор CEACAM представляет собой молекулу антитела к CEACAM. Иллюстративные антитела к CEACAM-1 описаны в WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251 и WO 2014/022332, например, моноклональное антитело 34B1, 26H7 и 5F4; или его рекомбинантная форма, описанная, например, в US 2004/0047858, US 7132255 и WO 99/052552. В некоторых вариантах осуществления антитело к CEACAM связывается с CEACAM-5, как описано, например, в Zheng et al. *PLoS One*. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146), или перекрестно реагирует с CEACAM-1 и CEACAM-5, как описано, например, в WO 2013/054331 и US 2014/0271618.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что молекулы клеточной адгезии, относящиеся к раково-эмбриональному антигену (CEACAM), такие как CEACAM-1 и CEACAM-5, опосредуют, по меньшей мере частично, ингибирование противоопухолевого иммунного ответа (см., например, Markel et al. *J Immunol*. 2002 Mar 15;168(6):2803-10; Markel et al. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):6062-71; Markel et al. *Immunology*. 2009 Feb;126(2):186-200; Markel et al. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Feb;59(2):215-30; Ortenberg et al. *Mol Cancer Ther*. 2012 Jun;11(6):1300-10; Stern et al. *J Immunol*. 2005 Jun 1;174(11):6692-701; Zheng et al. *PLoS One*. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529). Например, CEACAM-1 была описана в качестве гетерофильного лиганда TIM-3, а также она играет роль в опосредованной TIM-3 толерантности и истощении Т-клеток (см., например, WO 2014/022332; Huang, et al. (2014) *Nature* doi:10.1038/nature13848). В вариантах осуществления было показано, что совместная блокада CEACAM-1 и TIM-3 усиливает противоопухолевый иммунный ответ в ксенотрансплантатных моделях колоректального рака (см., например, WO 2014/022332; Huang, et al. (2014) выше). В некоторых вариантах осуществления совместная блокада CEACAM-1 и PD-1 снижает толерантность Т-клеток, как описано, например, в WO 2014/059251. Таким образом, ингибиторы CEACAM могут применяться с другими иммуномодуляторами, описанными в данном документе (например, ингибиторами PD-1 и/или TIM-3), для усиления иммунного ответа против рака, например, меланомы, рака легкого (например, NSCLC), рака мочевого пузыря, рака



толстой кишки, рака яичников и других форм рака, описанных в данном документе.

LAG3 (ген-3 активации лимфоцитов или CD223) представляет собой молекулу клеточной поверхности, экспрессируемую на активированных Т-клетках и В-клетках, которая, как было показано, играет роль в истощении CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы LAG3 и его лигандов, доступны в данной области техники и могут применяться в комбинации с CAR, например, CAR, описанным в данном документе. Например, BMS-986016 (Bristol-Myers Squib) представляет собой моноклональное антитело, которое нацеливается на LAG3. IMP701 (Immutep) представляет собой антагонистическое антитело к LAG3, а IMP731 (Immutep и GlaxoSmithKline) представляет собой истощающее антитело к LAG3. Другие ингибиторы LAG3 включают IMP321 (Immutep), который представляет собой рекомбинантный слитый белок из растворимой части LAG3 и Ig, который связывается с молекулами МНС класса II и активирует антигенпрезентирующие клетки (APC). Другие антитела раскрыты, например, в WO2010/019570.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое усиливает активность клетки, экспрессирующей CAR, может представлять собой, например, слитый белок, содержащий первый домен и второй домен, при этом первый домен представляет собой ингибирующую молекулу или ее фрагмент, а второй домен представляет собой полипептид, который ассоциирован с положительным сигналом, например, полипептид, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид, который ассоциирован с положительным сигналом, может содержать костимулирующий домен CD28, CD27, ICOS, например, внутриклеточный сигнальный домен CD28, CD27 и/или ICOS, и/или первичный сигнальный домен, например, CD3-дзета, например, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления слитый белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует CAR.

В одном варианте осуществления средство, которое усиливает активность описанной в данном документе клетки, экспрессирующей CAR, представляет собой miR-17-92.

#### Фармацевтические композиции и средства лечения

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать клетку, экспрессирующую CAR, например, совокупность клеток, экспрессирующих CAR, описанных в данном документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатообразующие средства, такие как EDTA или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению в одном аспекте составлены для

внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить с помощью способа, отвечающего требованиям к лечению (или предупреждению) заболевания. Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания пациента, хотя отвечающие требованиям дозировки могут быть определены с помощью клинических испытаний.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит, например, в ней отсутствуют выявляемые уровни контаминанта, например, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, репликационно-компетентного лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, gag HIV, остаточных количеств гранул, покрытых антителами к CD3/антителами к CD28, мышинных антител, объединенной сыворотки крови человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки крови, компонентов питательной среды, клеточных или плазмидных компонентов для упаковки векторов, бактерии и гриба. В одном варианте осуществления бактерия представляет собой по меньшей мере бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* группы A.

В случае если указано "иммунологически эффективное количество", "противоопухолевое эффективное количество", "эффективное для ингибирования опухоли количество" или "терапевтическое количество", - точное количество композиций по настоящему изобретению, подлежащих введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, весе, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состояния пациента (субъекта). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, описанные в данном документе, может быть введена в дозе, составляющей от  $10^4$  до  $10^9$  клеток/кг веса тела, в некоторых случаях от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг веса тела, включая все целочисленные значения в пределах этих диапазонов. В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, описанные в данном документе, могут быть введены при  $3 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  или  $1 \times 10^7$  клеток/кг веса тела. Композиции на основе клеток можно также вводить несколько раз в этих дозах. Клетки можно вводить с помощью методик инфузии, которые являются общеизвестными в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988).

В некоторых аспектах может потребоваться введение субъекту активированных клеток, например, Т-клеток или НК-клеток, а затем последовательный повторный отбор крови (или осуществление афереза), активация клеток из нее в соответствии с настоящим изобретением и осуществление повторной инфузии этих активированных и размноженных клеток пациенту. Этот процесс можно осуществлять несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах можно активировать клетки, например, Т-клетки

или NK-клетки, полученные из образцов крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых аспектах активируют клетки, например, T-клетки или NK-клетки, полученные из образцов крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см или 100 куб. см.

Введение заявленных композиций можно осуществлять с помощью любого подходящего способа, в том числе аэрозольной ингаляции, инъекции, приема внутрь, трансфузии, имплантации или трансплантации. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутривенно, интратуморально, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, с помощью внутривенной (i.v.) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте композиции на основе клеток, например, композиции на основе T-клеток или NK-клеток по настоящему изобретению, вводят пациенту посредством внутривенной или подкожной инъекции. В другом аспекте композиции на основе клеток, например, композиции на основе T-клеток или NK-клеток по настоящему изобретению, вводят пациенту посредством i.v. инъекции. Композиции на основе клеток, например, композиции на основе T-клеток или NK-клеток, можно инъецировать непосредственно в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

В конкретном иллюстративном аспекте субъект может подвергаться лейкоферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или истощают *ex vivo* для отбора и/или выделения клеток, представляющих интерес, например, T-клеток или NK-клеток. Такие изоляты, например, изоляты T-клеток или NK-клеток, можно размножать с помощью способов, известных в данной области техники, и обрабатывать таким образом, чтобы можно было ввести одну или несколько конструкций CAR по настоящему изобретению, за счет чего обеспечивается создание клетки, экспрессирующей CAR, например, CAR-T-клетки или NK-клетки, экспрессирующей CAR по настоящему изобретению. Затем субъектов, нуждающихся в этом, можно подвергать стандартному лечению с помощью высокодозовой химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных аспектах после или параллельно с трансплантатом субъекты получают инфузию размноженных клеток, экспрессирующих CAR по настоящему изобретению. В дополнительном аспекте размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

В вариантах осуществления у субъекта проводят лимфодеплецию, например, перед введением одной или нескольких клеток, которые экспрессируют CAR, описанный в данном документе. В вариантах осуществления лимфодеплеция включает введение одного или нескольких из мелфалана, цитоксана, циклофосфида и флударабина.

Дозировка вышеуказанных средств лечения, подлежащих введению пациенту, будет меняться в зависимости от точной природы состояния, подлежащего лечению, и реципиента средства лечения. Определение дозы для введения человеку можно осуществлять в соответствии с практикой, принятой в данной области техники. Доза для терапевтического средства, например, антитела, например CAMPATH, например, обычно может находиться, например, в диапазоне от 1 до приблизительно 100 мг для взрослого

пациента, например, при введении ежедневно в течение периода от 1 до 30 дней. Подходящая суточная доза составляет от 1 до 10 мг в день, хотя в некоторых случаях могут применяться более высокие дозы, составляющие не более 40 мг в день (описанные в патенте США № 6120766).

В одном варианте осуществления CAR вводят в клетки, например, Т-клетки или НК-клетки, например, с применением транскрипции *in vitro*, и субъект (например, человек) получает начальное введение клетки, экспрессирующей CAR (например, CAR-Т-клетки или НК-клетки, экспрессирующей CAR) по настоящему изобретению, и одно или несколько последующих введений клетки, экспрессирующей CAR (например, CAR-Т-клетки или НК-клетки, экспрессирующей CAR) по настоящему изобретению, где одно или несколько последующих введений выполняют менее чем через 15 дней, например, через 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) обеспечивают более чем одно введение клеток, экспрессирующих CAR, например, CAR-Т-клеток или НК-клеток, экспрессирующих CAR по настоящему изобретению, в неделю, например, обеспечивают 2, 3 или 4 введения клеток, экспрессирующих CAR, например, CAR-Т-клеток или НК-клеток, экспрессирующих CAR по настоящему изобретению, в неделю. В одном варианте осуществления субъект (например, субъект-человек) получает более одного введения клеток, экспрессирующих CAR, в неделю, например, CAR-Т-клеток или НК-клеток, экспрессирующих CAR (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также называемые в данном документе циклом), с последующей неделей без введения клеток, экспрессирующих CAR, например, введений CAR-Т-клеток или введений НК-клеток, экспрессирующих CAR, и затем субъекту обеспечивают одно или несколько дополнительных введений клеток, экспрессирующих CAR, например, CAR-Т-клеток или НК-клеток, экспрессирующих CAR (например, более одного введения клеток, экспрессирующих CAR, например, CAR-Т-клеток или НК-клеток, экспрессирующих CAR, в неделю). В другом варианте осуществления субъект (например, человек) получает более одного цикла введения клеток, экспрессирующих CAR (например, CAR-Т-клеток или НК-клеток, экспрессирующих CAR), и промежутки времени между каждым циклом составляет менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дней. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие CAR, например, CAR-Т-клетки или НК-клетки, экспрессирующие CAR, вводят раз в два дня для обеспечения 3 введений в неделю. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие CAR, например, CAR-Т-клетки или НК-клетки, экспрессирующие CAR по настоящему изобретению, вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или больше недель.

В некоторых вариантах осуществления субъекты могут быть взрослыми субъектами (т. е. возрастом 18 лет и старше). В определенных вариантах осуществления субъекты могут быть возрастом от 1 года до 30 лет. В некоторых вариантах осуществления субъекты являются 16-летними или старше. В определенных вариантах осуществления субъекты имеют возраст от 16 до 30 лет. В некоторых вариантах

осуществления субъекты являются субъектами детского возраста (т. е. возрастом от 1 года до 18 лет).

В одном аспекте клетки, экспрессирующие CAR, получают с применением вирусных векторов на основе лентивируса, таких как лентивирус. Полученные таким путем клетки, экспрессирующие CAR, например CART, будут характеризоваться стабильной экспрессией CAR.

В одном аспекте клетки, экспрессирующие CAR, например, CAR-T, временно экспрессируют векторы CAR в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. Временная экспрессия CAR может осуществляться с помощью доставки вектора на основе РНК CAR. В одном аспекте РНК CAR трансдуцируют в клетку, например, НК-клетку или Т-клетку, с помощью электропорации.

Потенциальной проблемой, которая может возникать у пациентов, лечение которых осуществляют с помощью временно экспрессирующих CAR-T-клеток или НК-клеток, экспрессирующих CAR (в частности, клеток, экспрессирующих CAR, несущих мышинный scFv), является анафилаксия после нескольких введений средства лечения.

Не ограничиваясь данной теорией, полагают, что такой анафилактический ответ может быть вызван развитием у пациента гуморального ответа против CAR, т. е. антитела к CAR, имеющего изотип IgE-антитела. Считается, что в клетках пациента, продуцирующих антитела, происходит переключение класса с изотипа IgG (который не вызывает анафилаксии) на изотип IgE, если между воздействиями антигена существует перерыв продолжительностью от десяти до четырнадцати дней.

Если у пациента имеется высокий риск развития ответа в виде антитела к CAR во время курса терапии с временными CAR (такими как образуемые при трансдукциях РНК), то перерывы между инфузиями CART не должны длиться более десяти - четырнадцати дней.

#### Способы доставки с помощью биополимера

В некоторых вариантах осуществления одну или несколько клеток, экспрессирующих CAR, описанных в данном документе, можно вводить или доставлять субъекту с помощью биополимерного каркаса, например, биополимерного имплантата. Биополимерные каркасы могут поддерживать или усиливать доставку, размножение и/или распространение описанных в данном документе клеток, экспрессирующих CAR. Биополимерный каркас содержит биосовместимый (например, по существу не вызывающий воспаление или иммунный ответ) и/или биоразлагаемый полимер, который может быть встречающимся в природе или синтетическим.

Примеры подходящих биополимеров включают без ограничения агар, агарозу, альгинат, альгинатный/цемент на основе фосфата кальция (CPC), бета-галактозидазу ( $\beta$ -GAL), (1,2,3,4,6-пентаацетил-D-галактозу), целлюлозу, хитин, хитозан, коллаген, эластин, желатин, гиалуроновую кислоту с коллагеном, гидроксиапатит, сополимер 3-гидроксипропаноата и 3-гидроксигексаноата (PHBHHx), поли(лактид), поли(капролактон) (PCL), сополимер лактида и гликолида (PLG), полиэтиленоксид (PEO), сополимер

молочной кислоты и гликолевой кислоты (PLGA), полипропиленоксид (PPO), поливиниловый спирт (PVA), шелк, соевый белок и изолят соевого белка, отдельно или в комбинации с любой другой полимерной композицией, в любой концентрации и в любом отношении. Биополимер может быть дополнен или модифицирован молекулами, способствующими адгезии или миграции, например, пептидами, имитирующими коллаген, которые связываются с коллагеновым рецептором лимфоцитов, и/или стимулирующими молекулами для усиления доставки, размножения или функции, например противораковой активности, клеток, подлежащих доставке. Биополимерный каркас может быть инъекцируемым, например, гелем, или полутвердым веществом, или твердой композицией.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки, экспрессирующие CAR, высевают в биополимерный каркас перед доставкой субъекту. В вариантах осуществления биополимерный каркас дополнительно содержит одно или несколько дополнительных терапевтических средств, описанных в данном документе (например, другую клетку, экспрессирующую CAR, антитело или низкомолекулярное соединение), или средств, которые усиливают активность клетки, экспрессирующей CAR, например, встроенные в биополимеры каркаса или конъюгированные с ним. В вариантах осуществления биополимерный каркас вводят инъекцией, например, интратуморально, или хирургическим путем имплантируют в опухоль или в непосредственной близости от опухоли так, чтобы это было достаточно для опосредования противоопухолевого эффекта. Дополнительные примеры биополимерных композиций и способов их доставки описаны в Stephan et al., Nature Biotechnology, 2015, 33:97-101 и WO2014/110591.

#### Примеры

Настоящее изобретение дополнительно подробно описано посредством ссылки на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры приведены лишь с целью иллюстрации и не предполагаются как ограничивающие, если не указано иное. Поэтому настоящее изобретение никоим образом не следует истолковывать как ограниченное следующими примерами, а наоборот, следует истолковывать как охватывающее все без исключения видоизменения, которые становятся очевидными как следствие идеи, приведенной в данном документе.

Пример 1. Активность *in vitro* Т-клеток с тандемным и двойным CAR, нацеливающимися на CD19 и CD22

В данном примере демонстрируется активность *in vitro* Т-клеток с тандемным и двойным CAR.

Тандемные химерные антигенные рецепторы (CAR) экспрессируют два различающихся домена scFv в виде части одного и того же белка в тандеме. Двойные CAR состоят из двух полноразмерных CAR. В данном случае эти два CAR кодируются одним лентивирусным вектором, при этом они разделены элементом рибосомного проскока P2A. Как в тандемном, так и в двойном CAR, описанных в данном документе, используются одинаковые стимулирующие домены: 4-1BB и CD3-дзета. Тандемный и двойной CAR

клонировали в лентивирусные векторы экспрессии (Pelps) для трансдукции первичных Т-клеток.

Тандемные CAR, использованные в данном примере, представляют собой следующие: c171, c182, c224 и c227. Двойные CAR, тестируемые в данном примере, представляют собой c201 и c230 (которые оба содержат CAR для CD22, расположенный выше CAR для CD19), а также c203 (который содержит CAR для CD19, расположенный выше CAR для CD22). C230, хотя и характеризуется одинаковой с c201 аминокислотной последовательностью, получали с использованием разных кодонов, поэтому он имеет другую последовательность ДНК. Также в данном примере использовали соответствующие моно-CAR: CD22-65s, распознающий CD22, и c206, распознающий CD19.

Конструкции сравнивали посредством тестирования эффекторных Т-клеточных ответов Т-клеток, трансдуцированных тандемным и двойным CAR, в ответ на мишени, экспрессирующие CD19 и CD22 (Nalm6), экспрессирующие CD22 (CD19KO) или экспрессирующие CD19 (CD22KO). Ответы эффекторных Т-клеток включают без ограничения клеточное размножение, пролиферацию, удвоение количества, продуцирование цитокинов и уничтожение целевых клеток или цитолитическую активность (дегрануляцию).

### Результаты

#### *Получение CAR-T-клеток*

Лентивирусные векторы для переноса Pelps, кодирующие CAR, использовали для получения геномного вирусного материала, упакованного в псевдотипированные лентивирусные частицы VSVg. ДНК лентивирусного вектора, кодирующую CAR, смешивали с тремя компонентами упаковки VSVg, gag/pol и rev в комбинации с реагентом липофектамин для трансфекции клеток Lenti-X 293T (Clontech) с последующей заменой среды через 12-18 ч. Затем через 30 часов среду собирали, фильтровали, концентрировали осаждением и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

CAR-T-клетки получали, начиная с крови от подвергнутых аферезу здоровых доноров, чьи Т-клетки обогащали путем отрицательного отбора (набор для выделения всех Т-клеток, Miltenyi). Затем Т-клетки активировали посредством добавления гранул CD3/CD28 (Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific) при соотношении 1:3 (Т-клетка:гранула) в среде для Т-клеток (RPMI1640, 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 2 мМ L-глутамин, 1x пенициллин/стрептомицин, 100 мМ заменимых аминокислот, 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ Нерес и 55 мМ 2-меркаптоэтанол) при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Т-клетки культивировали из расчета  $0,5 \times 10^6$  Т-клеток в 1 мл среды на лунку 24-луночного планшета. Через 24 часа, когда Т-клетки бластировали, добавляли вирусную надосадочную жидкость; Т-клетки трансдуцировали при множественности инфицирования (MOI), составляющей 5. Т-клетки начинали пролиферировать, что контролировали путем измерения концентрации клеток (в виде количества на мл), и Т-

клетки разбавляли свежей средой для Т-клеток каждые два дня. Как только Т-клетки начинали переходить в фазу покоя через примерно 10 дней, логарифмический рост уменьшался. Комбинация замедления скорости роста и уменьшения размера Т-клеток (достигая 350 фл) определяет момент времени криоконсервации Т-клеток для последующего анализа. Все CAR-T-клетки получали в производственных условиях исследовательского уровня (т. е. не клинического уровня). Перед криоконсервацией процентное содержание трансдуцированных клеток (экспрессирующих на клеточной поверхности CAR, специфический в отношении CD22 и/или CD19) определяли посредством анализа на основе проточной цитометрии на FACS Fortessa (BD). Вирусная трансдукция демонстрировала сравнимые уровни экспрессии, что указывало на схожую эффективность трансдукции соответствующих CAR. Подсчет клеток в культурах CAR-T-клеток показал отсутствие выявляемого отрицательного влияния CAR на способность Т-клеток пролиферировать по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками ("UTD").

#### *Оценка эффективности CAR-перенаправленных Т-клеток*

Чтобы оценить функциональные способности данных Т-клеток с двойными CAR, CAR-T, полученные как описано выше, размораживали, подсчитывали и культивировали совместно с раковыми клетками для анализа их способности к уничтожению и секреции цитокинов. В одном эксперименте двойные CAR-T c201 и c203 сравнивали с аналогами моно-CAR c206 (CART19) и CD22-65s. В ходе второго эксперимента сравнивали двойные CAR-T c201 и c230 с тандемными CAR-T c171, c182, c188, c224 и c227, а также с аналогами моно-CAR c206 (CART19) и CD22-65s. Нетрансдуцированные Т-клетки (UTD) служили в качестве контрольных ненацеливающих Т-клеток в обоих экспериментах.

Т-клеточный цитолиз направляли на линии острого лимфобластного лейкоза (ALL) Nalm6 (RRID: CVCL\_0092) и соответствующую CD22-отрицательную линию (CD22KO), а также на CD19-отрицательную линию (CD19KO), полученную посредством CRISPR-модификации Nalm6. Все линии клеток трансдуцировали для экспрессии люциферазы в качестве репортера для оценки жизнеспособности/уничтожения клеток. Показатели цитолитической активности CAR-T измеряли при титровании соотношений эффектор:целевая клетка (E:T) 10:1, 5:1, 2,5:1, 1,25:1, 0,63:1 и 0,31:1. Анализы начинали путем смешивания соответствующего количества Т-клеток с фиксированным количеством целевых клеток (25000 клеток на лунку 96-луночного планшета). Через 20 часов оставшиеся клетки в лунках лизировали путем добавления реагента Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) для количественного определения оставшихся раковых клеток, экспрессирующих люциферазу, в каждой лунке. "% цитолиза" рассчитывали в отношении лунок, содержащих только целевые клетки (0% уничтожения, максимальный сигнал люциферазы). Данные, полученные с CD22KO Nalm6-люцифераза, показывают, что трансдукция с помощью лентивирусов, кодирующих двойной или c206 CAR-T, передает цитолитическую активность Т-клеткам в отношении CD19 (**фиг. 3А**). Данные, полученные с CD19KO Nalm6-люцифераза, показывают, что трансдукция с помощью лентивирусов, кодирующих двойной, тандемный или CD22-65s CART, передает



цитолитическую активность Т-клеткам в отношении CD22 (**фиг. 3В**). UTD Т-клетки показывают только фоновый цитолиз. Все три двойных CAR-T показывали несколько более высокую степень CD19- и CD22-опосредованного уничтожения обеих целевых клеток KO Nalm6.

Для измерения продуцирования цитокинов данными CAR-T-клетками в ответ на целевые клетки, экспрессирующие CD22 и/или CD19, CAR-T-клетки культивировали совместно с теми же линиями ALL, как указано выше. Кроме того, CAR-T культивировали совместно с линией ALL SEM. Клетки культивировали при соотношении эффектор:мишень 1:1 и количестве 25000 клеток на лунку 96-луночного планшета в течение 24 ч, после чего среду удаляли для анализа цитокинов с использованием набора V-PLEX Human IFN-g (Meso Scale Diagnostics). Все двойные, тандемные и моно-CAR-T выразили стимуляцию целевыми клетками, экспрессирующими CD19 (Nalm6, CD22KO Nalm6 и SEM; **фиг. 3С и 3D**). Однако данные по уровням IFN-g, секретируемого CAR-T, стимулированными посредством только CD22 (CD19KO Nalm6), показывали улучшенную стимуляцию двойных CAR-T c201 и c230 по сравнению с c203 и тандемными CAR-T. Секретируемые уровни IFN-g для C201 и c230 были сопоставимы с моно-CAR-T CD22-65s (**фиг. 3С и 3D**).

В ходе данного исследования двойные CAR-T c201, c203 и c230 показали лучшую активность в отношении уничтожения клеток, чем тандемные и моно-CAR-T. В то время как двойные CAR-T демонстрировали схожую активность в отношении секреции IFN-g при совместном культивировании с целевыми клетками, экспрессирующими CD19, c201 демонстрировали лучшую активацию по сравнению с c203. Как c201, так и c230 демонстрировали лучшую активацию по сравнению с тандемными CAR-T, тестируемыми в ходе данного исследования.

**Пример 2. Активность in vivo двойных и тандемных CAR-T, нацеливающихся на CD19 и CD22**

В данном примере демонстрируется активность in vivo Т-клеток с двойным и тандемным CAR.

Тандемные химерные антигенные рецепторы (CAR) экспрессируют два различающихся домена scFv в виде части одного и того же белка в тандеме. Двойные CAR состоят из двух полноразмерных CAR. В данном примере эти два CAR кодируются одним лентивирусным вектором, при этом они разделены элементом рибосомного проскока P2A. Как в тандемном, так и в двойном CAR, описанных в данном документе, используются одинаковые стимулирующие домены: 4-1BB и CD3-дзета. Тандемный и двойной CAR клонировали в лентивирусные векторы экспрессии (Pelps) для трансдукции первичных Т-клеток.

Тандемные CAR, использованные в данном примере, представляют собой следующие: c171, c182, c224 и c227. Двойные CAR, использованные в данном примере, представляют собой c201 и c230, в которых CAR для CD22 расположен выше CAR для CD19. C230, хотя и характеризуется одинаковой с c201 аминокислотной

последовательностью, получали с использованием разных кодонов, поэтому он имеет другую последовательность ДНК. Соответствующие моно-CAR, используемые в данном исследовании, представляют собой CD22-65s, распознающий CD22, и c206, распознающий CD19. Противоопухолевую активность Т-клеток с двойным и тандемным CAR оценивали *in vivo* на ксенотрансплантатной модели рецидива ALL.

#### *Материалы и способы*

Линии клеток: Nalm6 (RRID: CVCL\_0092) представляет собой линию клеток острого лимфобластного лейкоза (ALL) человека. С применением технологии CRISPR осуществляли нокаут гена CD19 (CD19KO). Клетки выращивали в среде RPMI, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, и обе выращивали в суспензии. Клетки поддерживали и размножали у мышей при внутривенной имплантации. Клетки были модифицированы для экспрессии люциферазы так, что рост опухолевых клеток также можно контролировать путем визуализации мышей после инъекции им субстрата, представляющего собой люциферин.

Мыши. Мышей NSG возрастом 6 недель (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tmlWjl</sup>/SzJ) получали от Jackson Laboratory (номенклатурный номер 005557). Обеспечивали акклиматизацию животных в течение по меньшей мере 3 дней до эксперимента. Животных содержали в соответствии с соответствующими правилами и руководствами. Электронные транспонеры для идентификации животных имплантировали в левый бок за один день до имплантации опухоли.

Имплантация опухоли. Клетки Nalm6 и CD19KO Nalm6 в логарифмической фазе роста собирали и промывали в пробирках Falcon объемом 50 мл при 1200 об./мин в течение 5 минут, однократно в питательной среде и затем два раза в холодном стерильном PBS. Клетки ресуспендировали в PBS при концентрации  $5 \times 10^6$  на мл и соотношении Nalm6 и CD19KO Nalm6 20:1, помещали на лед и вводили мышам посредством инъекции. Раковые клетки вводили посредством внутривенной инъекции при 200 мкл через хвостовую вену. Эта модель хорошо растет при имплантации мышам внутривенно, которые могут быть визуализированы для измерения опухолевой нагрузки. После инъекции  $1 \times 10^6$  раковых клеток опухоли формируются и могут быть точно измерены в пределах 3 дней. Показатели измерения исходного уровня составляют  $4-6 \times 10^5$  фотонов/секунда (ф./с). В пределах 7 дней средний показатель измерения биoluminesценции составляет  $2-4 \times 10^6$  ф./с, а необработанные опухоли достигают показателя измерения в конечной точке ( $2-3 \times 10^9$ ) к 20-30 дням. Противоопухолевую активность терапевтических средств часто тестируют после полного приживления опухолей. Таким образом, в случае с этими моделями существует большой интервал, во время которого можно наблюдать противоопухолевую активность CAR-Т-клеток.

Получение CAR-Т-клетки: все CAR-Т-клетки получали в производственных условиях исследовательского уровня (т. е. не клинического уровня). Стандартное производство: CAR-Т-клетки получали, начиная с крови от подвергнутых аферезу здоровых доноров, чьи Т-клетки обогащали путем отрицательного отбора (набор для

выделения всех Т-клеток, Miltenyi). Затем Т-клетки активировали посредством добавления гранул CD3/CD28 (Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific) при соотношении 1:3 (Т-клетка:гранула) в среде для Т-клеток (RPMI1640, 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 2 mM L-глутамин, 1x пенициллин/стрептомицин, 100 mM заменимых аминокислот, 1 mM пирувата натрия, 10 mM Нерес и 55 mM 2-меркаптоэтанол) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Т-клетки культивировали из расчета 0,5×10<sup>6</sup> Т-клеток в 1 мл среды на лунку 24-луночного планшета. Через 24 часа, когда Т-клетки бластировали, добавляли вирусную надосадочную жидкость; Т-клетки трансдуцировали при множественности инфицирования (MOI), составляющей 5. Т-клетки начинали пролиферировать, что контролировали путем измерения концентрации клеток (в виде количества на мл), и Т-клетки разбавляли свежей средой для Т-клеток каждые два дня. Как только Т-клетки начинали переходить в фазу покоя через примерно 10 дней, логарифмический рост уменьшался. Комбинация замедления скорости роста и уменьшения размера Т-клеток (достигая 350 фл) определяет момент времени криоконсервации Т-клеток для последующего анализа. Перед криоконсервацией процентное содержание трансдуцированных клеток (экспрессирующих на клеточной поверхности CAR, специфический в отношении CD22 и/или CD19) определяли посредством анализа на основе проточной цитометрии на FACS Fortessa (BD). Вирусная трансдукция демонстрировала сравнимые уровни экспрессии, что указывало на схожую эффективность трансдукции соответствующих CAR. Подсчет клеток в культурах CAR-Т-клеток показал отсутствие выявляемого отрицательного влияния CAR на способность Т-клеток пролиферировать по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками ("UTD").

Введение доз CAR-Т-клеток. В ходе исследований Nalm6 мышам вводили дозы через 7 дней после имплантации опухоли. CAR-Т-клетки, полученные посредством стандартного производства, вводили в дозе 1×10<sup>6</sup> CAR+ Т-клеток. Клетки, полученные посредством быстрого способа получения, вводили в дозе 0,3 и 0,1×10<sup>6</sup> CAR+ Т-клеток. Для смешанного введения доз моно-CAR-Т c206 и CD22-65s смешивали при соотношении 1:1 в дозе, указанной ниже. В ходе исследования TMD8 мышам вводили дозу через 9 дней после имплантации опухоли в количестве 1×10<sup>6</sup> или 3×10<sup>6</sup> CAR+ Т-клеток. В качестве контролей мыши получали либо среду-носитель (PBS), либо UTD. С целью введения доз клетки частично размораживали на водяной бане при 37°C, а затем полностью размораживали путем добавления 1 мл подогретой питательной среды для Т-клеток. Размороженные клетки переносили в пробирку Falcon объемом 50 мл и доводили до конечного объема 12 мл с использованием среды для Т-клеток. Клетки дважды промывали и центрифугировали при 300 g в течение 10 минут, а затем подсчитывали с использованием Cellometer (Nexcelom). Затем Т-клетки ресуспендировали при соответствующих концентрациях в холодном PBS и держали на льду до введения дозы мышам. CAR-Т вводили посредством внутривенной инъекции в хвостовую вену в 200 мкл. Все клетки получали от одного и того же донора параллельно.

Контроль животных. Состояние здоровья мышей контролировали ежедневно, в том числе дважды в неделю измеряли вес тела. Контроль опухолей осуществляли также два раза в неделю посредством визуализации для исследований Nalm6.

### *Результаты*

Противоопухолевую активность Т-клеток с двойным и tandemным CAR оценивали на ксенотрансплантатной модели рецидива В-клеточного острого лимфобластного лейкоза. Пять процентов (5%) CD19-отрицательных, CD22-положительных клеток Nalm6 (CD19KO) смешивали с клетками Nalm6 дикого типа, которые экспрессировали как CD22, так и CD19. Раковые клетки подсчитывали, объединяли в комбинацию и вводили посредством инъекции в виде смешанной популяции. После имплантации опухолевых клеток в день 0 мышам, несущих опухоли, рандомизировали в группы, получающие обработку, и вводили им CAR-T-клетки внутривенно в латеральную хвостовую вену в день 7 после имплантации опухоли. Рост опухоли и здоровье животных контролировали до достижения животными конечной точки.

В ходе исследования с применением полученных стандартным способом CAR-T tandemные CAR-T c171, c182, c224, и c227 сравнивали с двойными CAR-T c201 и c230. Для справки моно-CAR-T c206 и CD22-65s вводили посредством инъекции отдельно или в смеси 1:1. В то время как все одиночные популяции CAR-T вводили посредством инъекции в дозе  $1 \times 10^6$  CAR+, смешанные CAR-T вводили посредством инъекции либо каждую в дозе  $1 \times 10^6$  CAR+ клеток (всего  $2 \times 10^6$  CAR-T, смесь 1e6), либо каждую в дозе  $0,5 \times 10^6$  CAR+ клеток (всего  $1 \times 10^6$  CAR-T, смесь 5e5). Мышей, которые получали PBS или UTD Т-клетки, умерщвляли на неделе 3, перед тем как опухоли приводили к снижению подвижности задних конечностей. Животных в других группах умерщвляли с 4 по 7 неделю. Среднее значение биолюминесценции для всех получавших обработку групп наносили на график, показанный на **фиг. 4А**.

Группа обработки PBS, которой вообще не вводили Т-клетки, демонстрировала исходные кинетические показатели роста опухоли Nalm6 у мышам NSG, получавших внутривенную инъекцию. Группа обработки UTD служила в качестве Т-клеточного контроля для демонстрации неспецифического ответа Т-клеток доноров-людей в данной модели, который не был выявлен. В используемой дозе моно-CAR-T c206, CD22-65s показывали наименьший ответ в данной модели рецидива. В случае всех tandemных CAR-T был отмечен значительно более медленный рост опухоли, однако в конечном итоге мышам умерщвляли из-за опухолевой нагрузки. Двойные CAR-T c201 и c230 продемонстрировали полную эрадикацию опухоли у нескольких мышам в группах обработки (см. **фиг. 4А**). Группа обработки смесью 1e6 показывала сходную эффективность, однако потребовалось вдвое больше CAR+ Т-клеток по сравнению с двойными CAR-T. Группа обработки смесью 5e5, которая получала такое же общее количество CAR-T, как и группа обработки двойными CAR-T, не показала таких же высоких результатов, что было сопоставимо с tandemными CAR-T, тестируемыми в данном исследовании.

Кинетические показатели размножения и персистенции CAR-T измеряли у этих животных посредством еженедельного анализа крови у них с помощью проточной цитометрии. Репрезентативные данные показаны для анализа через 2 недели после инъекции CAR-T (фиг. 4B). Оба двойных CAR-T, также как и тандемные CAR-T с182, с224 и с227 показывали сходные количества циркулирующих в крови Т-клеток в виде группы смеси  $1e6$ . Данные показатели были более высокими по сравнению с моно-CAR-T и группой смеси  $5e5$ .

Первые два исследования демонстрировали, что Т-клетки с двойным CAR с201 и с230 обладают способностью к эрадикации рака NALM6 и его CD19-отрицательного варианта. Эффективность превышала таковую для соответствующих моно-CAR-T, а также тандемных CAR-T, тестируемых в данном исследовании.

**Пример 3. Производство клеток с201 с применением процесса активации в малом масштабе**

В данном примере описана оценка технологичности производства Т-клеток с двойным CAR, нацеливающимся на CD19 и CD22, с применением процесса активации в малом масштабе.

Аликвоты замороженных Т-клеток размораживали на водяной бане при  $37^{\circ}\text{C}$ , помещали в Optimizer CM (среда Gibco Optimizer Media с добавлением  $+100$  ед./мл человеческого IL2) и центрифугировали в течение 5 минут при 1500 об./мин. Клетки подсчитывали и высевали в 24-луночный планшет при  $3 \times 10^6$  клеток/мл, 1 мл/лунка. TransAct добавляли в каждую лунку в количестве 1/100 (10 мкл/лунка). Вирус с201 со степенью чистоты, соответствующей GMP, добавляли при разных показателях множественности инфицирования (MOI) на основе титра, полученного в qPCR. Также высевали нетрансдуцированный контроль (UTD). После 24 часов культивирования клетки собирали и трижды промывали в PBS+1% HSA. Затем клетки подсчитывали и пересевали их в конечном количестве  $1 \times 10^6$  клеток/мл в 24-луночном планшете.

Через 72 часа после посева клетки собирали, подсчитывали и из каждого образца отбирали аликвоту  $5 \times 10^5$  клеток для анализа посредством проточной цитометрии. Клетки окрашивали с использованием Live/Dead Aqua (BV510) в течение 15 минут в количестве 100 мкл/лунка, а затем дважды промывали. Затем добавляли смесь антител (таблица 6) в количестве 50 мкл/лунка и инкубировали 25 минут при  $4^{\circ}\text{C}$ . Клетки снова дважды промывали, а затем фиксировали в течение 15 минут в 1,6% PFA в PBS в количестве 100 мкл/лунка. После фиксирования клетки промывали, как было описано ранее, и ресуспендировали в конечном объеме 150 мкл/образец в буфере для проточной цитометрии. Захват клеток  $5e4$  осуществляли посредством гейтирования по живым CD3-положительным клеткам в каждом образце на BD LSRFortessa (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния), и полученные данные анализировали с применением программного обеспечения FlowJo версии 10 (Ашленд, Орегон). Данную процедуру повторяли через 144 ч после посева.

**Таблица 6. Антитело и другие реагенты**

Маркер	Клон	Флуорохром	Поставщик	Номер по каталогу	Разведение
Live/Dead		BV510	Biolegend	423102	1/500
CD3	SK7	BUV395	BD	564001	1/200
CAR19	Антиидиотипическое антитело (Anti-Id)	PE	Реагент собственного изготовления		1/160
CD4	SK3	PerCP 5.5	Biolegend	344608	1/100
CAR22	Антиидиотипическое антитело (Anti-Id)	AF647	Реагент собственного изготовления		1/800
CD8	SK1	APC H7	BD	560179	1/200
Буфер для FACS			Miltenyi Biotec	130-091-222	
Исходный раствор BSA			Miltenyi Biotec	130-091-376	
Фосфатно-буферный солевой раствор (PBS)			Gibco	14190-144	
Параформальдегид (PFA)			Polysciences Inc.	18814-10	

Анализ посредством проточной цитометрии показал, что большинство CAR+ клеток экспрессировали CAR, нацеливающиеся как на CD19, так и на CD22, что было выявлено с помощью соответствующих антиидиотипических антител (фиг. 5A и 5B). Соотношение экспрессии моно-CAR и двойного CAR смещалось в сторону экспрессии двойного CAR с течением времени и стабилизировалось через 144 ч. В то же время уровень общей экспрессии CAR также возрастал. В оба момента времени экспрессия CAR зависела от MOI, демонстрируя повышение при более высокой MOI. Здесь показаны данные от одного представителя из нескольких доноров.

Пример 4. Производство клеток c201 с применением процесса активации в крупном масштабе

В данном примере описана оценка технологичности производства Т-клеток с двойным CAR, нацеливающимся на CD19 и CD22, с применением процесса активации в крупном полном клиническом масштабе.

Процесс активации CAR-Т-клеток начинали с получения сред, указанных в таблице 7. Криоконсервированный продукт, полученный путем лейкофереза, использовали в качестве исходного материала и обрабатывали для Т-клеточного обогащения.

*Таблица 7. Тип сред и буфера и их назначение для применения в ходе*

*производства CART*

Тип сред	Источник	Назначение для применения
Буфер CliniMACS <sup>®</sup> / сывороточный альбумин человека (HSA) (0,5% в рабочей концентрации)	Приготовлен исполнителем в день 0	День 0: обработка в устройстве для промывки/отделения клеток
Среды для быстрого производства	Приготовлены исполнителем в день 0	День 0: для посева клеток
PBS/HSA (1% или 2% в рабочей концентрации)	Приготовлен исполнителем в день 0	Сбор и получение культуры: среды для промывки (день 1)
Cryostor10 (CS10)	Коммерчески доступна	Составление собранных клеток

Криоконсервированные образцы, полученные с помощью лейкафареза, размораживали, промывали и затем подвергали отбору и обогащению Т-клетками с использованием технологии на основе микрогранул CliniMACS<sup>®</sup>. Жизнеспособные клетки, отобранные с помощью микрогранул Miltenyi, высевали на Centricult в Prodigy<sup>®</sup>, который представляет собой неувлажняемую камеру для инкубации. Клетки, находящиеся в культуре, суспендировали в среде для процесса быстрого производства, которая представляла собой среду на основе OpTmizer<sup>™</sup> CTS<sup>™</sup>, содержащую добавку CTS<sup>™</sup> (ThermoFisher), GlutaMax, IL-2 и 2% заменителя Immune cell serum replacement вместе с ее компонентами для ускорения активации и трансдукции Т-клеток. Жизнеспособные ядродержащие клетки (VNC) активировали с использованием TransACT (Miltenyi) и трансдуцировали с лентивирусным вектором с201, кодирующим оба CAR. Лентивирусную трансдукцию осуществляли в день посева после добавления TransACT в клетки, разбавленные в питательной среде. Клетки трансдуцировали вирусом с201 со степенью чистоты, соответствующей GMP, при множественности инфицирования (MOI), составляющей 1, на основе титра, полученного в qPCR. Лентивирусный вектор размораживали непосредственно перед использованием в течение не более 30 минут при комнатной температуре.

С начала процесса в день 0 до начала промывки культуры и сбора CAR-Т-клетки культивировали в течение 20 часов после посева. После культивирования суспензию клеток дважды промывали в культуре и однократно промывали при сборе в камере Centricult.

После промывки при сборе на CliniMACS<sup>®</sup> Prodigy<sup>®</sup> в день 1 отбирали образцы суспензии клеток для подсчета жизнеспособных клеток и определения жизнеспособности. Затем клеточную суспензию переносили в центрифугу для осаждения вручную.

Надосадочную жидкость удаляли и клеточный осадок ресуспендировали в CS10 (BioLife Solution) с получением в результате продукта с конечной концентрацией DMSO в составе, составляющей ~10%. Затем клетки распределяли в отдельные пакеты для криоконсервации и отбор аналитических образцов осуществлялся в криофлаконы.

Индикаторные флаконы размораживали, а затем клетки подсчитывали и пересеивали их в конечном количестве  $1 \times 10^6$  клеток/мл в 24-луночной планшете. Через 72 часа после посева клетки собирали, подсчитывали и из каждого образца отбирали аликвоту  $5 \times 10^5$  клеток для анализа посредством проточной цитометрии. Клетки окрашивали с использованием Live/Dead Aqua (BV510) в течение 15 минут в количестве 100 мкл/луночка, а затем дважды промывали. Затем добавляли смесь антител (таблица 5) в количестве 50 мкл/луночка и инкубировали 25 минут при 4°C. Клетки снова дважды промывали, а затем фиксировали в течение 15 минут в 1,6% PFA в PBS в количестве 100 мкл/луночка. После фиксирования клетки промывали, как было описано ранее, и ресуспендировали в конечном объеме 150 мкл/образец в буфере для проточной цитометрии. Захват клеток  $5 \times 10^4$  осуществляли посредством гейтирования по живым CD3-положительным клеткам в каждом образце на BD LSRFortessa (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния), и полученные данные анализировали с применением программного обеспечения FlowJo версии 10 (Ашленд, Орегон). Данную процедуру повторяли через 144 ч после посева.

В результате полномасштабного процесса ARM получали продукт CAR-T с 12% общей экспрессией CAR, что было определено через 144 ч после трансдукции; 9% двойных CAR<sup>+</sup> клеток и 3% моно-CAR22<sup>+</sup> клеток (фиг. 5C). Из экспериментов с применением активации в малом масштабе видно, что общий % CAR, а также доля двойных CAR по сравнению с моно-CAR повышались с течением времени.

Пример 5. Активность *in vivo* двойных и моно-CAR-T, нацеливающихся на CD19 и CD22

В данном примере демонстрируется активность *in vivo* Т-клеток с двойным и моно-CAR, произведенных в соответствии со стандартным способом (TM) и способом с активацией (AP). Т-клетка с двойным CAR, использованные в данном примере, представляла собой c201, который содержит CAR для CD22, расположенный выше CAR для CD19, полученный с помощью процесса с активацией. Соответствующие моно-CAR-T, использованные в данном исследовании, представляли собой CD22-65s, распознающие CD22 и полученные посредством TM, и CAR19 (мышинные scFv), распознающие CD19 и полученные посредством TM и AP. Противоопухолевую активность Т-клеток с двойным и моно-CAR оценивали *in vivo* на ксенотрансплантатной модели ALL.

#### *Материалы и способы*

В примере 2 приводится описание исследования на животных. В данном примере использовали Nalm6 дикого типа (RRID: CVCL\_0092), линию клеток острого лимфобластного лейкоза (ALL) человека.

Введение доз CAR-T-клеток. Мышам вводили дозы клеток через 7 дней после



имплантации опухоли. CAR-T-клетки с CD22-65s, полученные посредством стандартного производства, вводили в дозе 3, 1 и  $0,3 \times 10^6$  CAR+ T-клеток. Клетки CAR19, полученные посредством AP, вводили в дозе 1 и  $0,3 \times 10^6$  CAR+ T-клеток; CAR19, полученные посредством TM, вводили в дозе 1, 0,3, и  $0,1 \times 10^6$  CAR+ T-клеток. T-клетки с двойным CAR C201, полученные посредством AP, вводили в дозе 0,3, 0,1 и  $0,03 \times 10^6$  CAR+ T-клеток. В качестве контролей мыши получали либо среду-носитель (PBS), либо UTD.

### *Результаты*

Противоопухолевую активность T-клеток с двойным и моно-CAR оценивали на ксенотрансплантатной модели B-клеточного острого лимфобластного лейкоза; клетки Nalm6 экспрессировали как CD19, так и CD22. После имплантации опухолевых клеток в день 0 мышей, несущих опухоли, рандомизировали в группы, получающие обработку, и вводили им CAR-T-клетки внутривенно в латеральную хвостовую вену в день 7 после имплантации опухоли. Рост опухоли и здоровье животных контролировали до достижения животными конечной точки.

Мышей, которые получали PBS или UTD T-клетки, умерщвляли на неделе 3, перед тем как опухоли приводили к снижению подвижности задних конечностей. Животных в других группах умерщвляли с 4 по 7 неделю. Среднее значение биолюминесценции для всех получавших групп, средство для обработки, наносили на график, показанный на **фиг. 6А**. Группа обработки PBS, которой вообще не вводили T-клетки, демонстрировала исходные кинетические показатели роста опухоли Nalm6 у мышей NSG, получавших внутривенную инъекцию. Группа обработки UTD служила в качестве T-клеточного контроля для демонстрации неспецифического ответа T-клеток от доноров-людей в данной модели, который не был выявлен. Для лучшего сравнения разные CAR-T в группах, получавших дозу  $0,3 \times 10^6$ , вместе представлены на графике на **фиг. 6В**. Оба CAR-T, полученные посредством TM, демонстрировали более низкую активность с незначительной задержкой роста опухоли для CAR19 (TM). В отличие от этого, обе CAR-T, полученные посредством AP, значительно снижали опухолевую нагрузку, при этом CAR-T c201 (AP) приводили к эрадикации опухоли (исходные уровни, BLI) у 4 из 5 мышей.

Кинетические показатели размножения и персистенции CAR-T измеряли у этих животных посредством еженедельного анализа крови у них с помощью проточной цитометрии. Собранные данные показаны на **фиг. 6С**. При сравнении групп CAR-T в дозе  $0,3 \times 10^6$  CAR-T, полученные посредством AP, демонстрировали лучшие показатели размножения. Сравнение c201 и CAR19 (оба получены посредством AP) демонстрирует сходные показатели размножения для CAR-T в дозе 0,3 и  $1 \times 10^6$  соответственно.

Данное исследование подчеркивает эффективность c201 также при производстве с использованием AP. C201 AP превосходил CAR19 (AP), а также CAR19 и CD22-65s (TM) в плане противоопухолевой активности и размножения клеток *in vivo*.

После подробного описания настоящего изобретения станет очевидно, что модификации, вариации и эквивалентные аспекты возможны без отступления от сущности

и объема настоящего изобретения, описанного в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения. Кроме того, следует понимать, что все примеры в настоящем изобретении представлены в качестве неограничивающих примеров.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(а) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен,

где:

(i) первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, и где нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты;

(ii) первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, и где нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты; и/или

(iii) первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, и где нуклеотидная последовательность, которая кодирует первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где первый CAR содержит:

первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен и первый костимулирующий сигнальный домен;

первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен и первый первичный сигнальный домен или

первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, первый трансмембранный домен, первый костимулирующий сигнальный домен и первый первичный сигнальный домен.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, где второй CAR содержит:

второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен и второй костимулирующий сигнальный домен;

второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен и второй первичный сигнальный домен или

второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен.

#### 4. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая:

(а) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и где CD22-связывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR3 HC), и переменную область легкой цепи (VL), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR3 LC), где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под:

(i) SEQ ID NO: 20, 21, 22, 28, 29 и 30 соответственно;

(ii) SEQ ID NO: 23, 24, 22, 31, 32 и 33 соответственно; или

(iii) SEQ ID NO: 25, 26, 27, 34, 32 и 30 соответственно; и

(б) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен, где CD19-связывающий домен содержит VH, содержащую CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, и VL, содержащую CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под:

(i) SEQ ID NO: 35, 36, 39, 40, 41 и 42 соответственно;

(ii) SEQ ID NO: 35, 37, 39, 40, 41 и 42 соответственно; или

(iii) SEQ ID NO: 35, 38, 39, 40, 41 и 42 соответственно.

#### 5. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где:

(i) CD22-связывающий домен первого CAR содержит аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 50 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; и/или

(ii) CD19-связывающий домен второго CAR содержит аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99%

идентичностью последовательности с ней.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 65.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый трансмембранный домен, отличается на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй трансмембранный домен.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 70.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый костимулирующий сигнальный домен, отличается на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй костимулирующий сигнальный домен.

10. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 75.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый первичный сигнальный домен, отличается на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% от нуклеотидной последовательности, кодирующей второй первичный сигнальный домен.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где:

(i) первый CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13 или 18 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней; и/или

(ii) второй CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или 17 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, где молекула CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или 16 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

14. Клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(а) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен,

где:

(i) первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, и где нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты;

(ii) первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, и где нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты; и/или

(iii) первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, и где нуклеотидная последовательность, которая кодирует первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

15. Клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(а) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и где CD22-связывающий домен содержит VH, содержащую CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, и VL, содержащую CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под:

- (i) SEQ ID NO: 20, 21, 22, 28, 29 и 30 соответственно;
- (ii) SEQ ID NO: 23, 24, 22, 31, 32 и 33 соответственно; или
- (iii) SEQ ID NO: 25, 26, 27, 34, 32 и 30 соответственно; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен, где CD19-связывающий домен содержит VH, содержащую CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, и VL, содержащую CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под:

- (i) SEQ ID NO: 35, 36, 39, 40, 41 и 42 соответственно;
- (ii) SEQ ID NO: 35, 37, 39, 40, 41 и 42 соответственно; или
- (iii) SEQ ID NO: 35, 38, 39, 40, 41 и 42 соответственно.

16. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где:

(i) CD22-связывающий домен первого CAR содержит аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 50 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; и/или

(ii) CD19-связывающий домен второго CAR содержит аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

17. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где:

(i) первый CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13 или 18 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней; и/или

(ii) второй CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или 17 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где:

(i) CD22-связывающий домен первого CAR содержит аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 50 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; и/или

(ii) CD19-связывающий домен второго CAR содержит аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

18. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где:

(i) первый CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13 или 18 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере

95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней; и/или

(ii) второй CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или 17 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

19. Клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая молекулу химерного антигенного рецептора (CAR), где указанная молекула CAR содержит:

(a) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22, и первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен,

где:

(i) первый трансмембранный домен и второй трансмембранный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, и где нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй трансмембранный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты;

(ii) первый костимулирующий сигнальный домен и второй костимулирующий сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 70 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, и где нуклеотидная последовательность, которая кодирует первый костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй костимулирующий сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты; и/или

(iii) первый первичный сигнальный домен и второй первичный сигнальный домен содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с ней, и где нуклеотидная последовательность, которая кодирует первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты, отличается от нуклеотидной последовательности, которая кодирует второй первичный сигнальный домен и содержится в молекуле нуклеиновой кислоты.

20. Клетка (например, иммунная эффекторная клетка), содержащая молекулу CAR, где молекула CAR содержит:

(a) первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22; первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен; и где CD22-связывающий домен содержит VH, содержащую CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, и VL, содержащую



CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под:

- (i) SEQ ID NO: 20, 21, 22, 28, 29 и 30 соответственно;
- (ii) SEQ ID NO: 23, 24, 22, 31, 32 и 33 соответственно; или
- (iii) SEQ ID NO: 25, 26, 27, 34, 32 и 30 соответственно; и

(b) второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19; второй трансмембранный домен; второй костимулирующий домен и/или второй первичный сигнальный домен, где CD19-связывающий домен содержит VH, содержащую CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, и VL, содержащую CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под:

- (i) SEQ ID NO: 35, 36, 39, 40, 41 и 42 соответственно;
- (ii) SEQ ID NO: 35, 37, 39, 40, 41 и 42 соответственно; или
- (iii) SEQ ID NO: 35, 38, 39, 40, 41 и 42 соответственно.

21. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где:

(i) CD22-связывающий домен первого CAR содержит аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 50 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; и/или

(ii) CD19-связывающий домен второго CAR содержит аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

22. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где:

(i) первый CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13 или 18 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней; и/или

(ii) второй CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или 17 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR по любому из пп. 1-13, где необязательно фармацевтическая композиция содержит вспомогательное вещество, носитель, разбавитель и/или стабилизатор.

24. Способ обеспечения противоопухолевого иммунитета, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей, например, экспрессирующей, нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR по любому из пп. 1-13.

25. Способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание, ассоциированное с антигеном (например, CD19 и/или CD22), включающий введение субъекту,

нуждающемся в этом, эффективного количества клетки, например, популяции иммунных эффекторных клеток, содержащей, например, экспрессирующей, нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу CAR по любому из пп. 1-13.

26. Способ по п. 24 или п. 25, где клетка представляет собой Т-клетку (например, CD4+ Т-клетку или CD8+ Т-клетку) или NK-клетку.

27. Способ по п. 25, где заболевание, ассоциированное с CD19 и/или CD22, выбрано из пролиферативного заболевания, например, рака или злокачественного новообразования, предракового состояния, например, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома или предлейкоза, или не связанного с раком показания, ассоциированного с экспрессией CD19 и/или CD22.

28. Способ по п. 27, где заболевание представляет собой рак, например, гематологический рак.

29. Способ по п. 28, где гематологический рак выбран из острого миелоидного лейкоза (AML), В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (BALL), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (SLL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического миелогенного лейкоза (СML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной лимфомы, крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественного лимфопролиферативного состояния, лимфомы MALT, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии или миелодиспластического синдрома, миелолипролиферативного новообразования, неходжкинской лимфомы (NHL), лимфомы Ходжкина, плазмобластной лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, предлейкоза или их комбинации.

30. Способ по п. 28, где гематологический рак представляет собой BALL у детей.

31. Способ по п. 28, где гематологический рак представляет собой BALL у взрослых.

32. Способ по п. 28, где гематологический рак представляет собой NHL.

33. Способ получения популяции клеток по любому из пп. 14-22, причем способ включает:

(i) приведение популяции клеток (например, Т-клеток, например Т-клеток, выделенных из замороженного или свежего продукта, полученного в результате лейкофереза) в контакт (например, связывание) со средством, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средством, которое стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности клеток;

(ii) приведение популяции клеток (например, Т-клеток) в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-13, за счет чего получают популяцию клеток (например, Т-клеток), содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, и

(iii) сбор популяции клеток (например, Т-клеток) для хранения (например, повторное составление популяции клеток в среде для криоконсервирования) или введения, где:

(а) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и

стадию (iii) проводят не позже чем через 30 (например, 26) часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 24 часа после начала стадии (i),

(b) стадию (ii) проводят вместе со стадией (i) или не позже чем через 20 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов после начала стадии (i), например, не позже чем через 18 часов после начала стадии (i), и

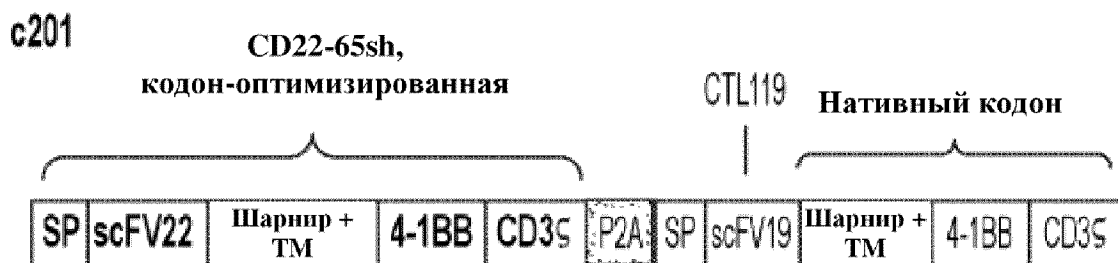
стадию (iii) проводят не позже чем через 30 часов после начала стадии (ii), например, не позже чем через 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 часов после начала стадии (ii), или

(c) популяцию клеток из стадии (iii) не размножают или размножают до увеличения количества клеток на не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40%, например не более чем 10%, например, согласно оценке по числу живых клеток, по сравнению с популяцией клеток в начале стадии (i),

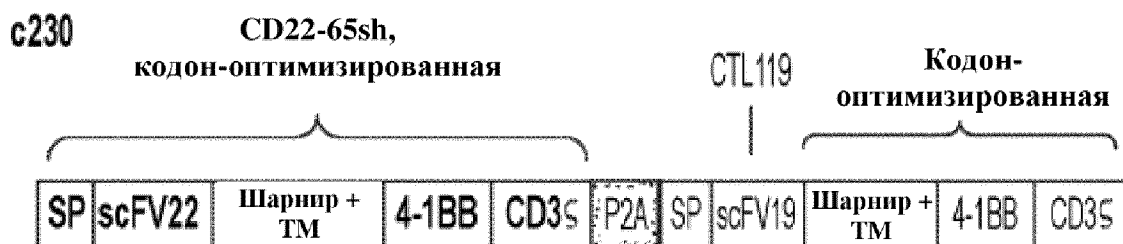
где необязательно молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) находится в вирусном векторе, где необязательно молекула нуклеиновой кислоты на стадии (ii) представляет собой молекулу РНК, находящуюся в вирусном векторе, где необязательно стадия (ii) включает трансдукцию популяции клеток (например, Т-клеток) с помощью вирусного вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR.

По доверенности

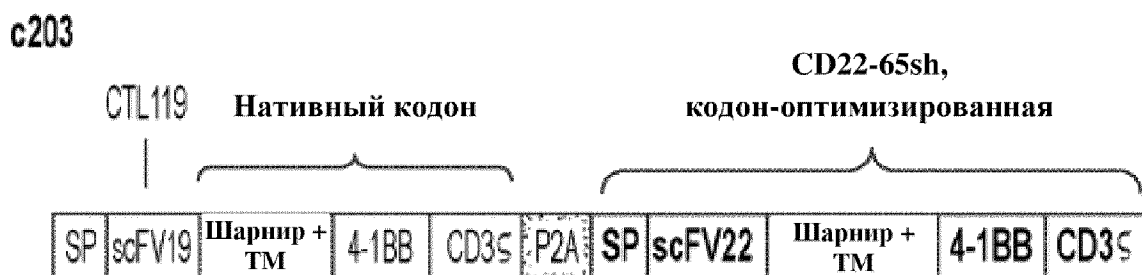
1/14



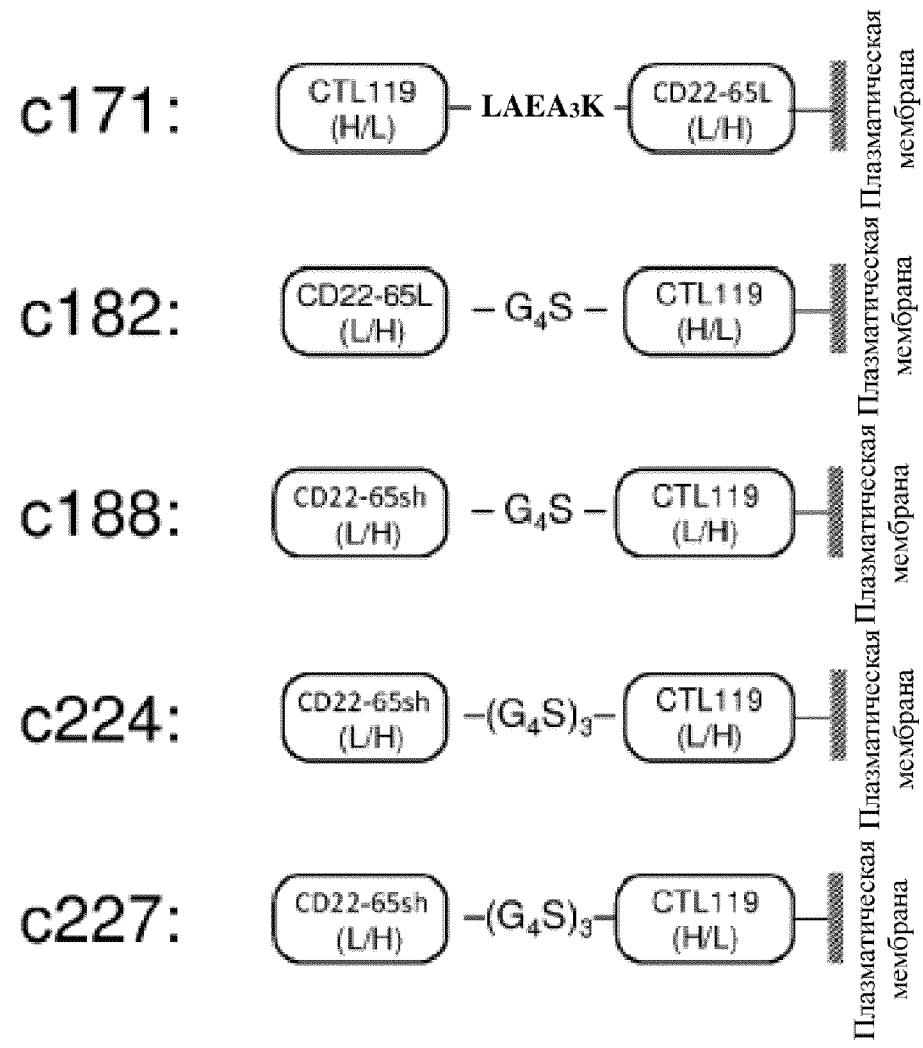
Фиг. 1А



Фиг. 1В

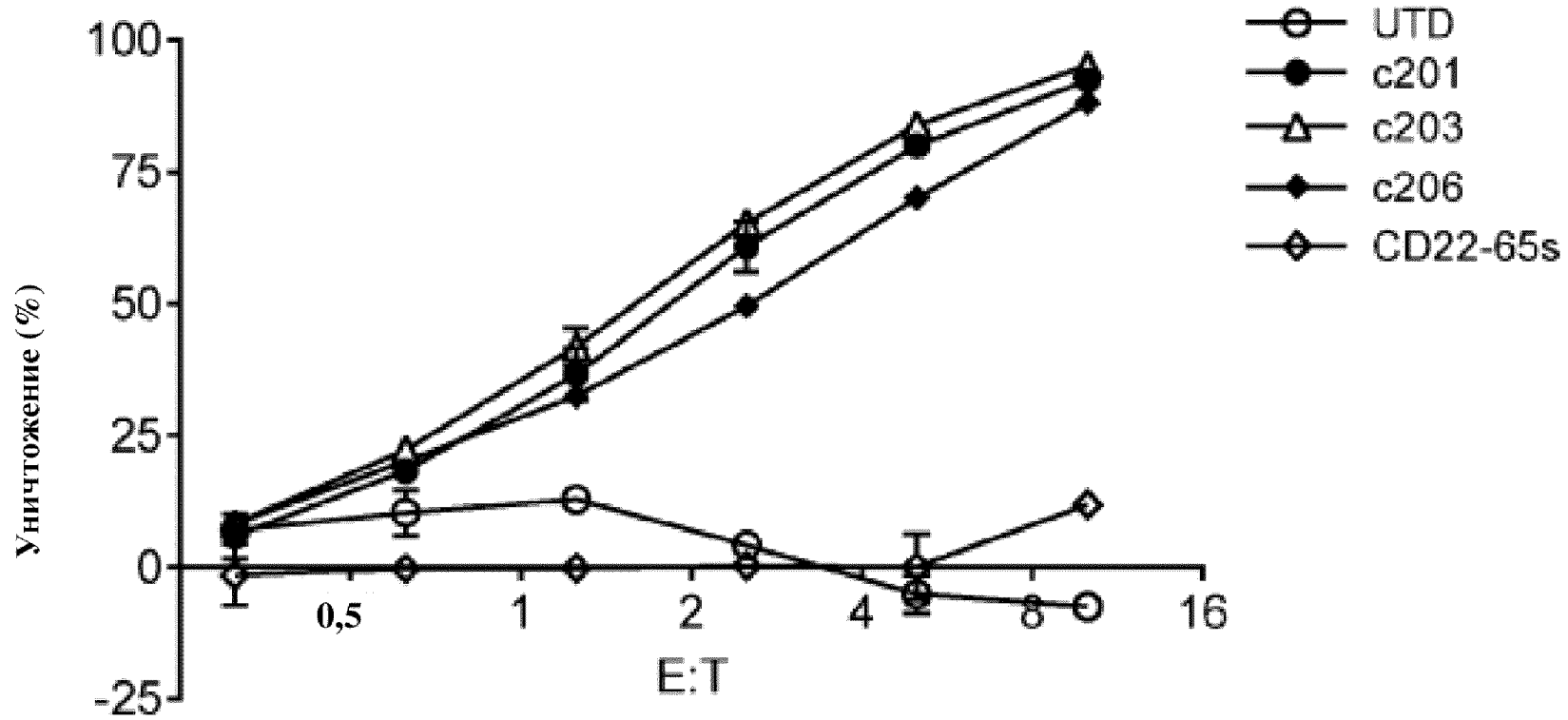


Фиг. 1С



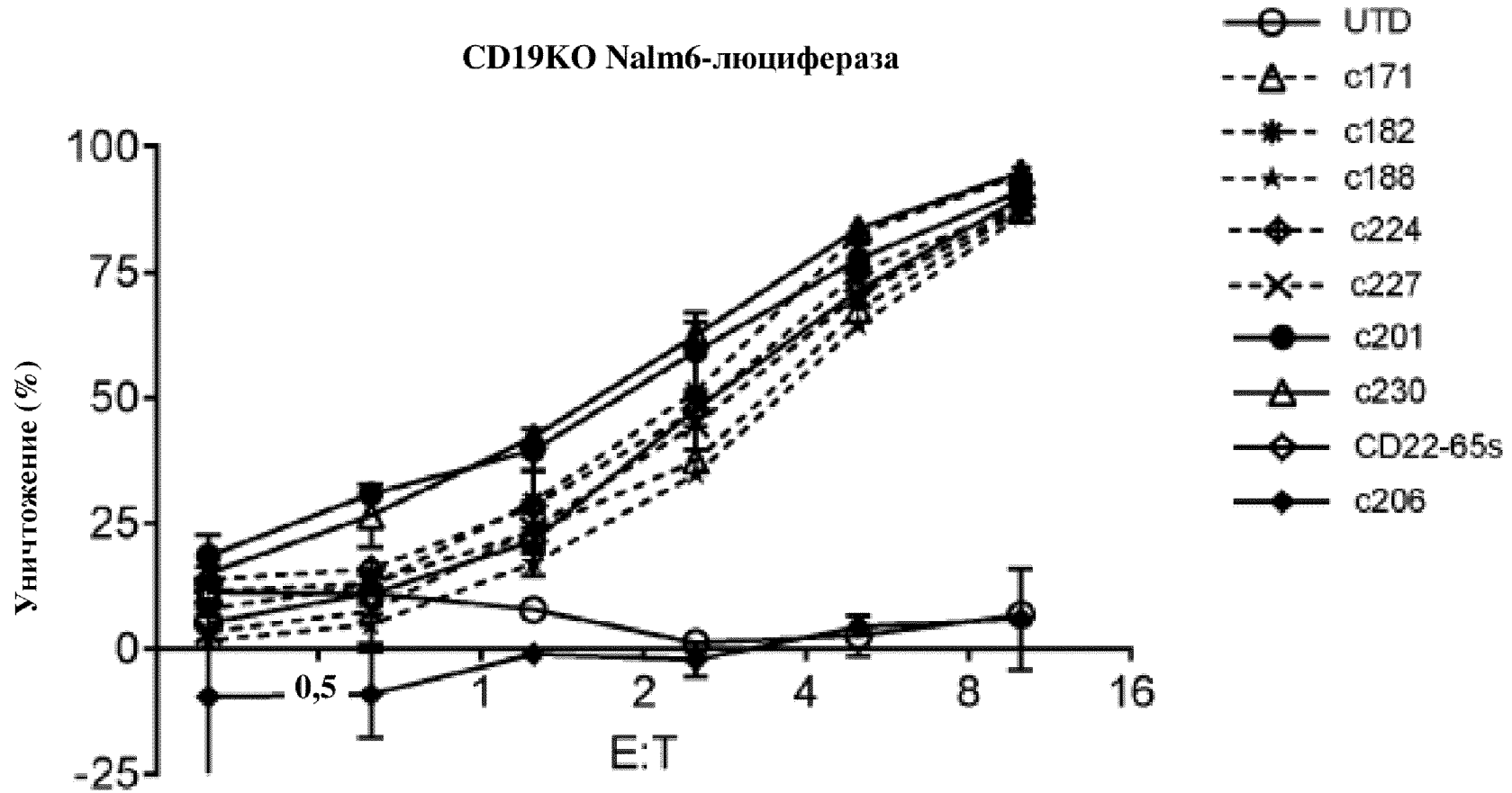
Фиг. 2

CD22KO Nalm6-люцифераза

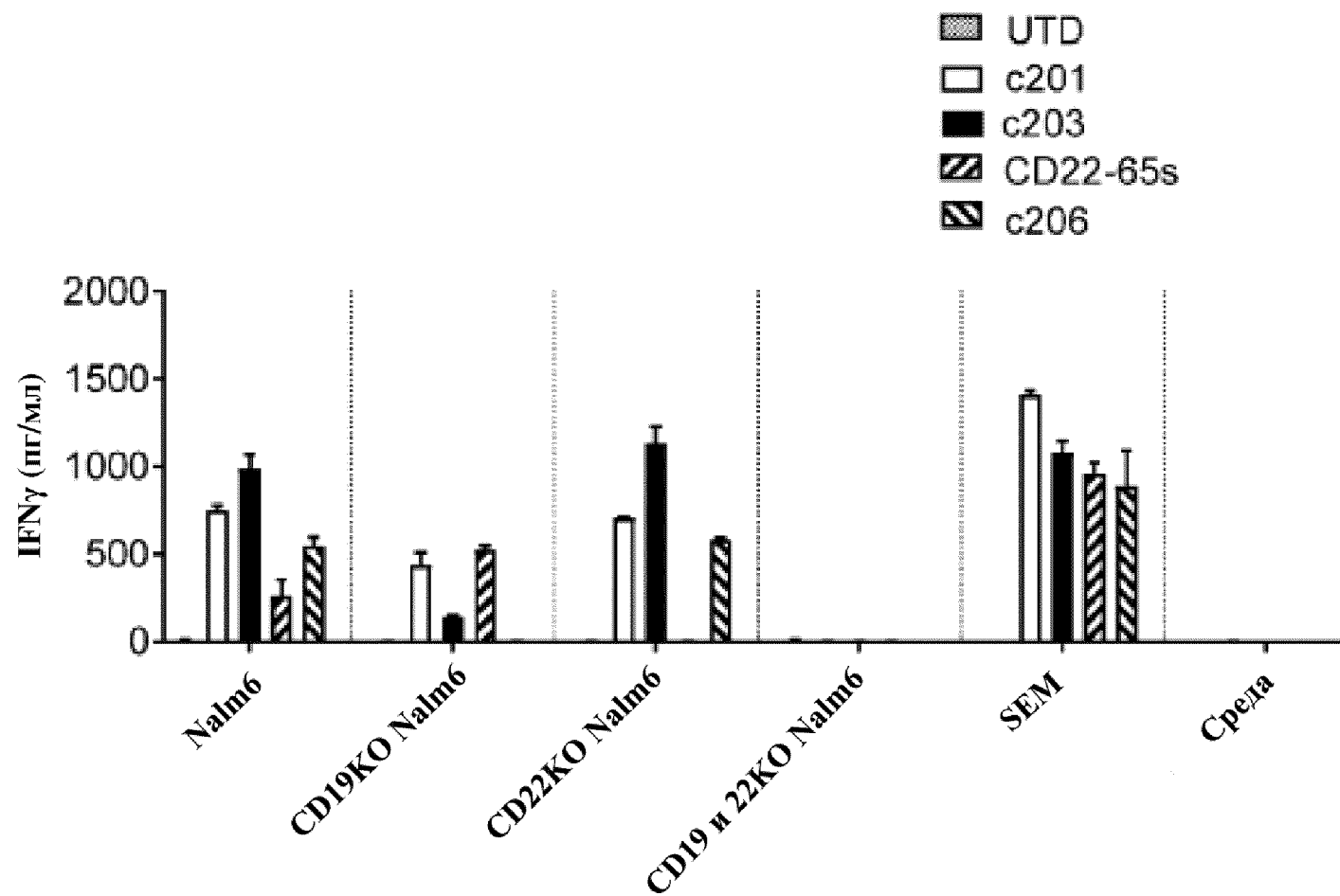


Фиг. 3А

CD19KO Nalm6-люцифераза

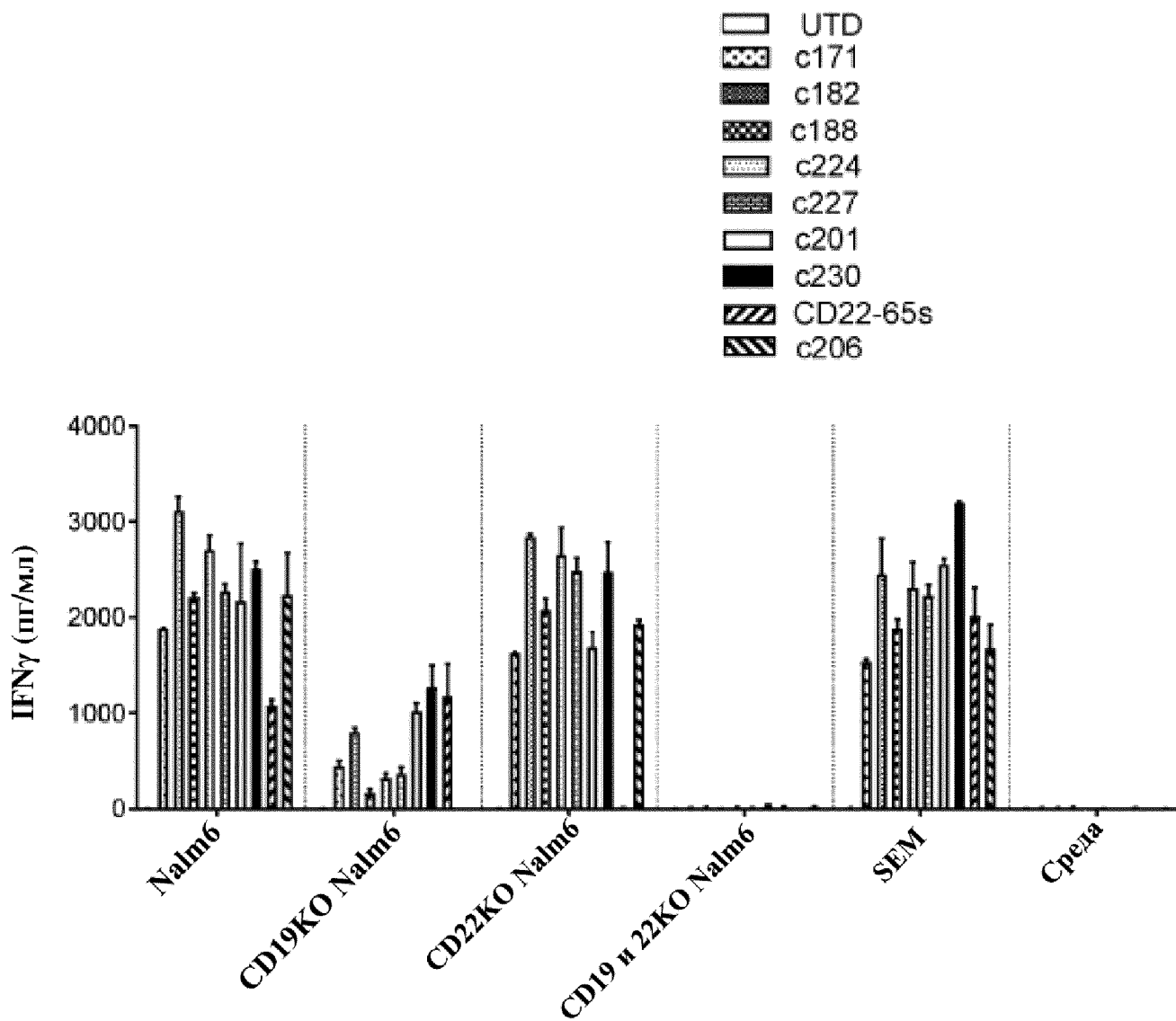


Фиг. 3В



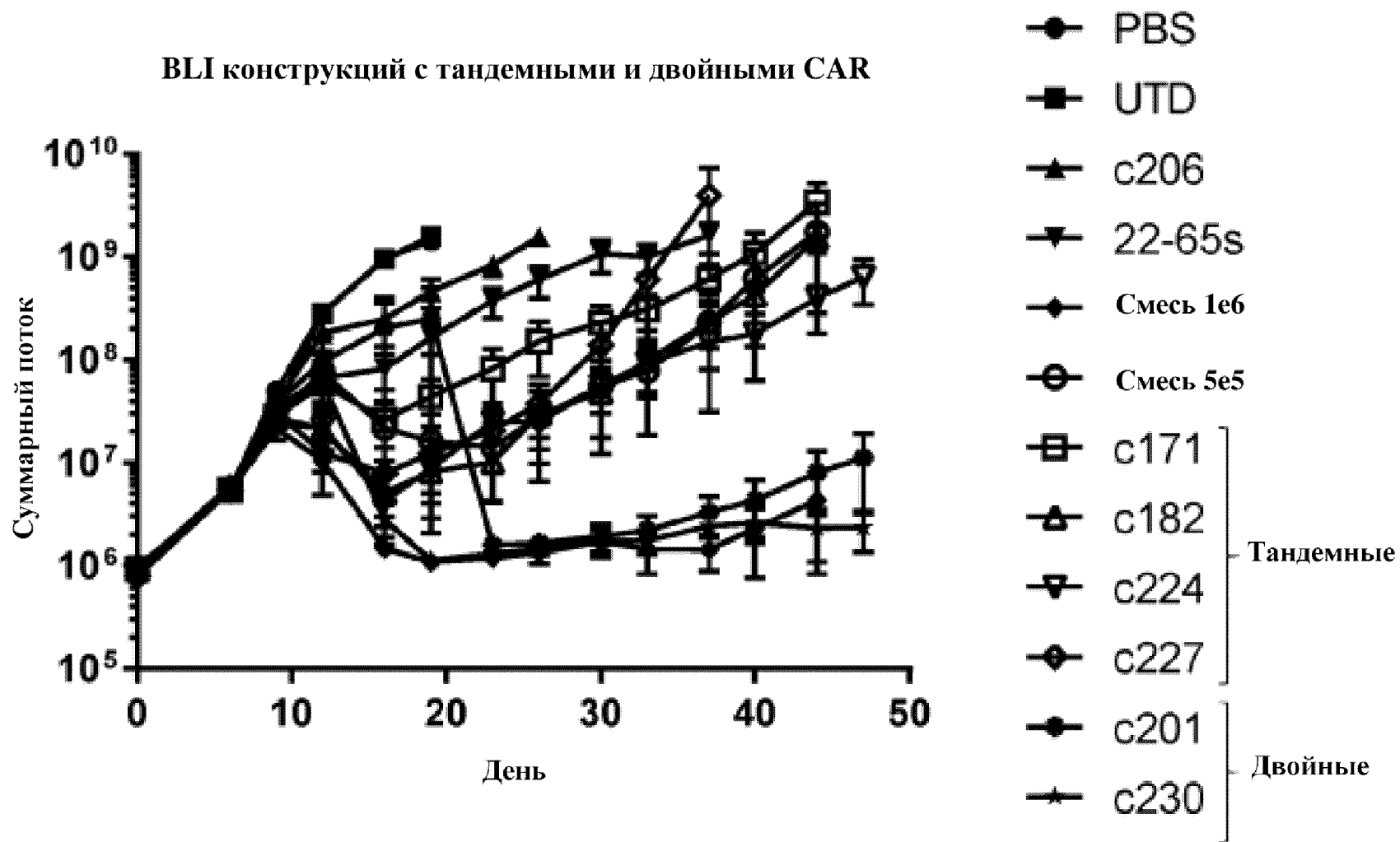
Фиг. 3С





Фиг. 3D

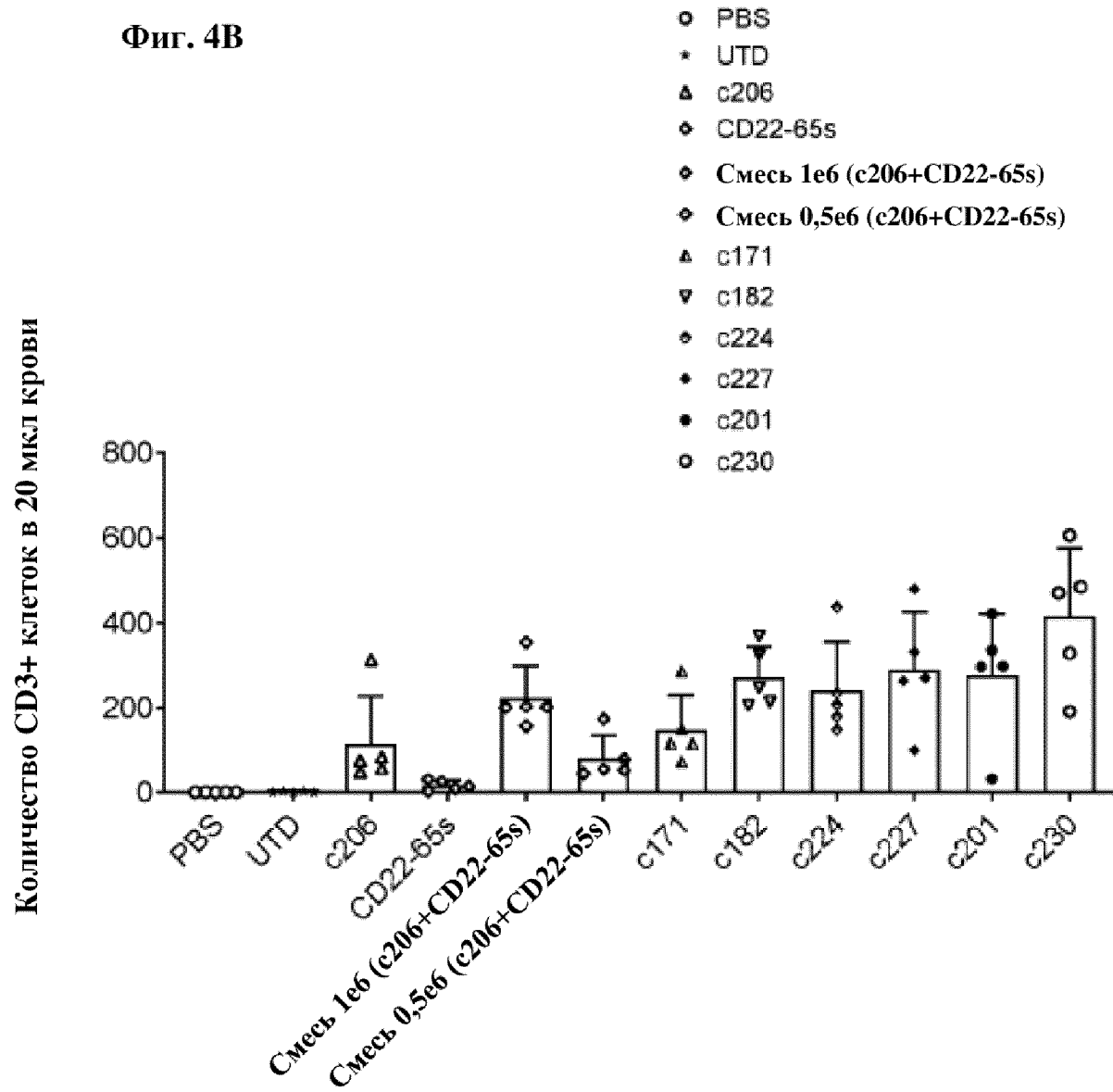
ВЛИ конструкций с тандемными и двойными CAR

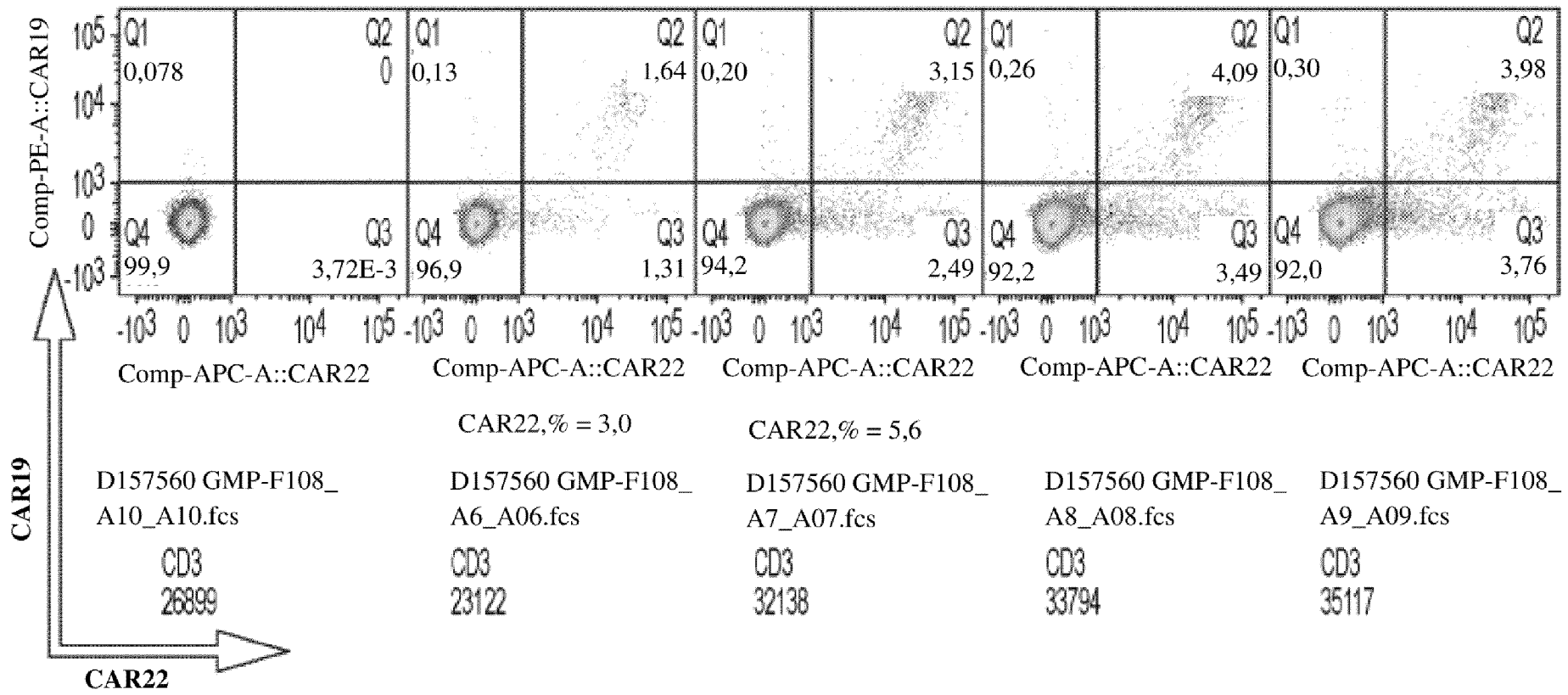


7/14

Фиг. 4А

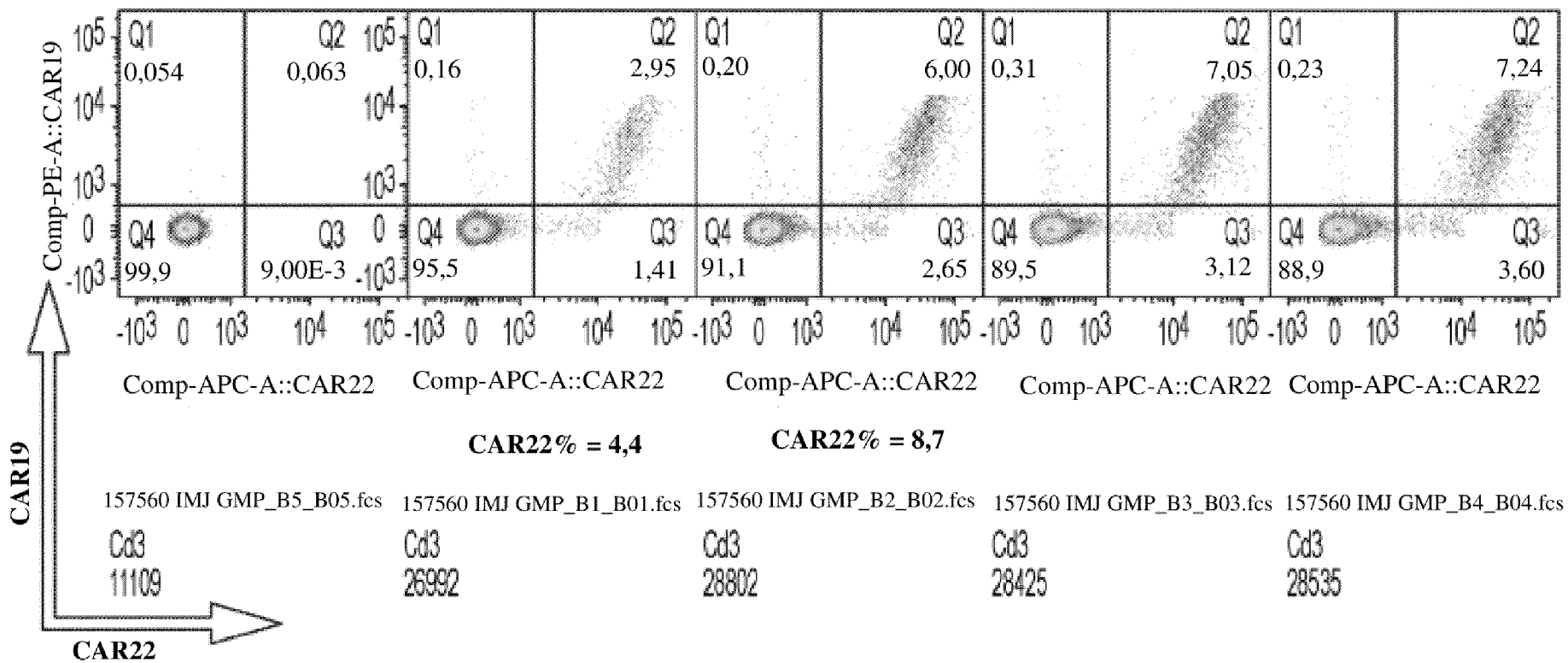
Фиг. 4В





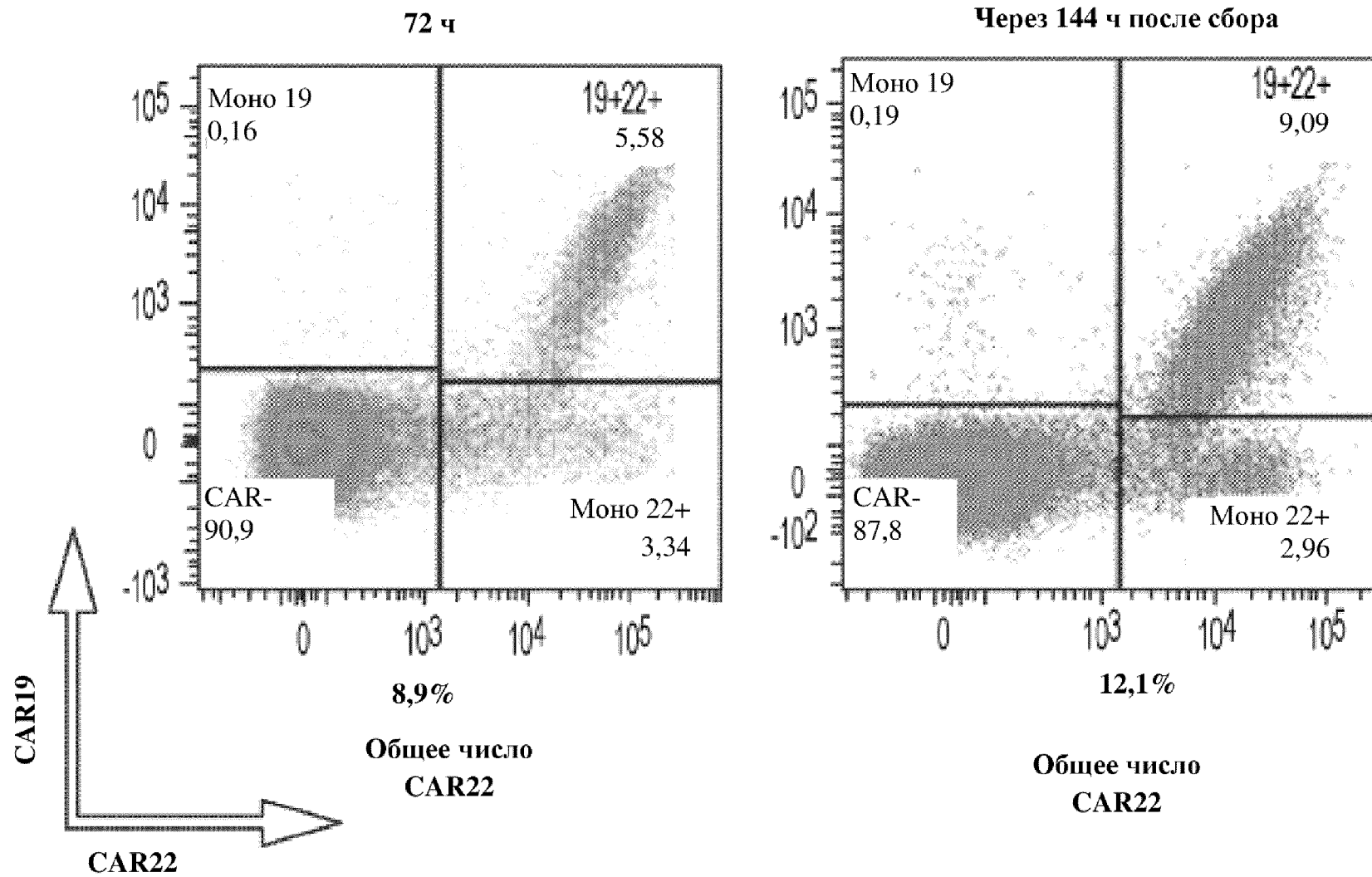
9/14

Фиг. 5А



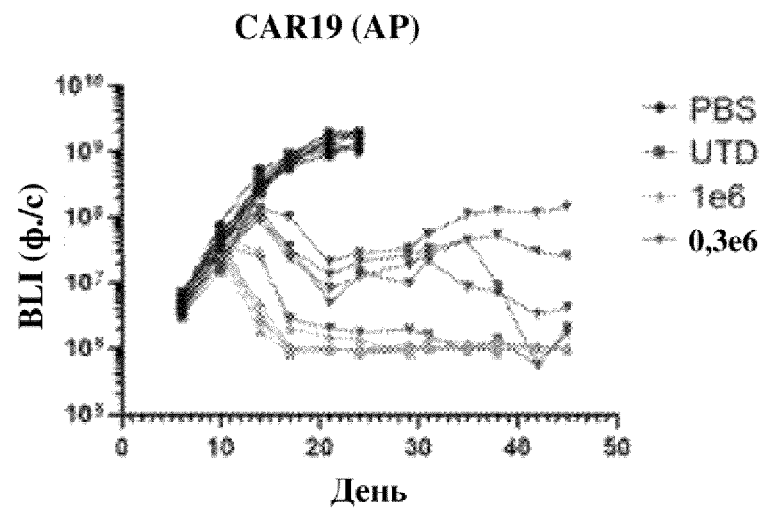
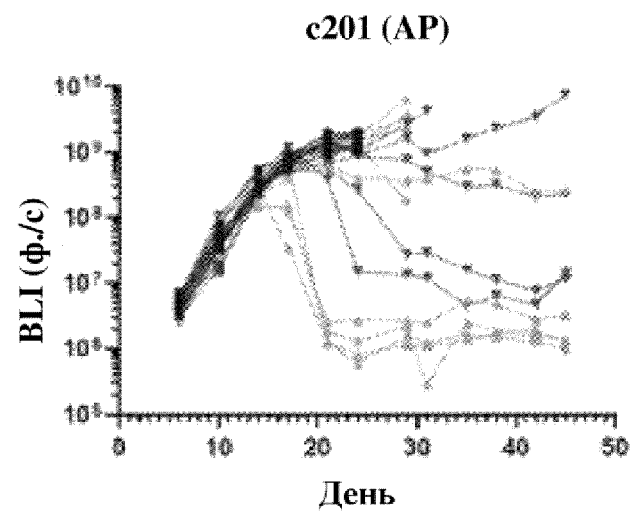
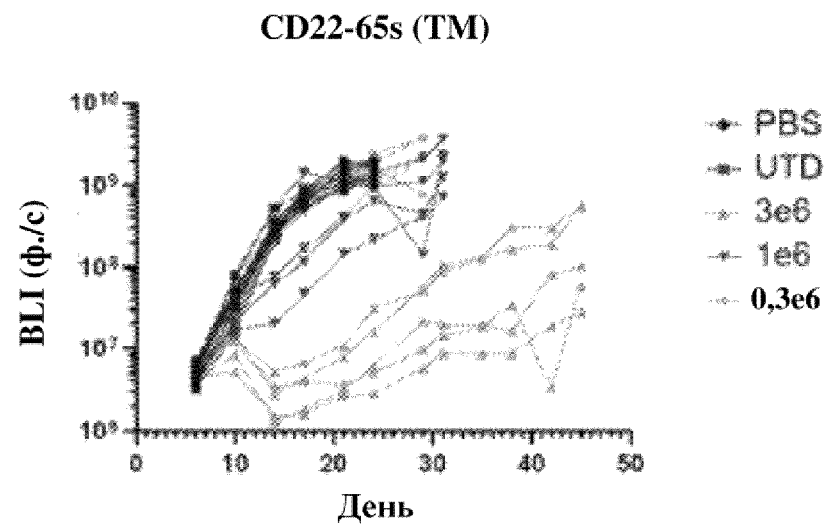
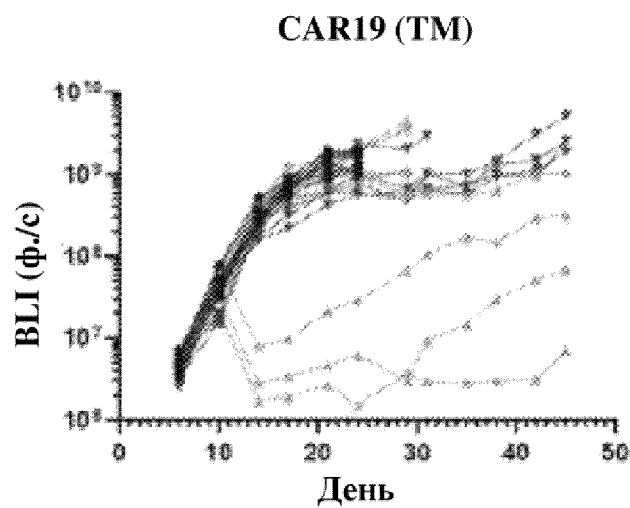
10/14

Фиг. 5В



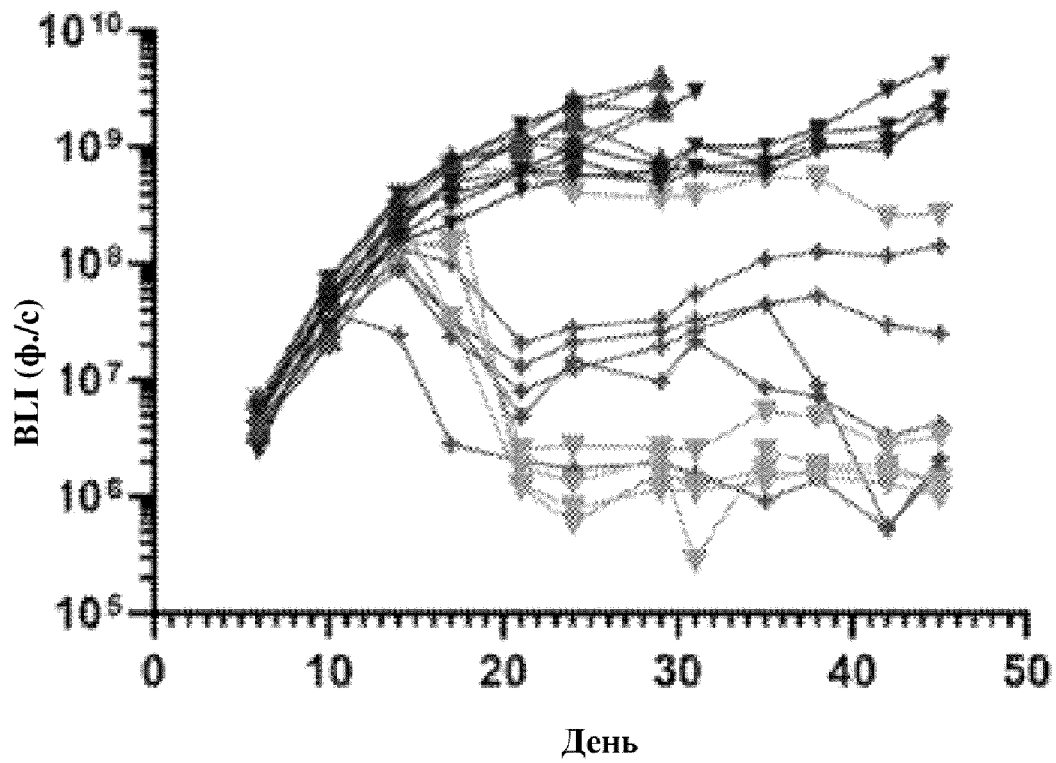
11/14

Фиг. 5С



12/14

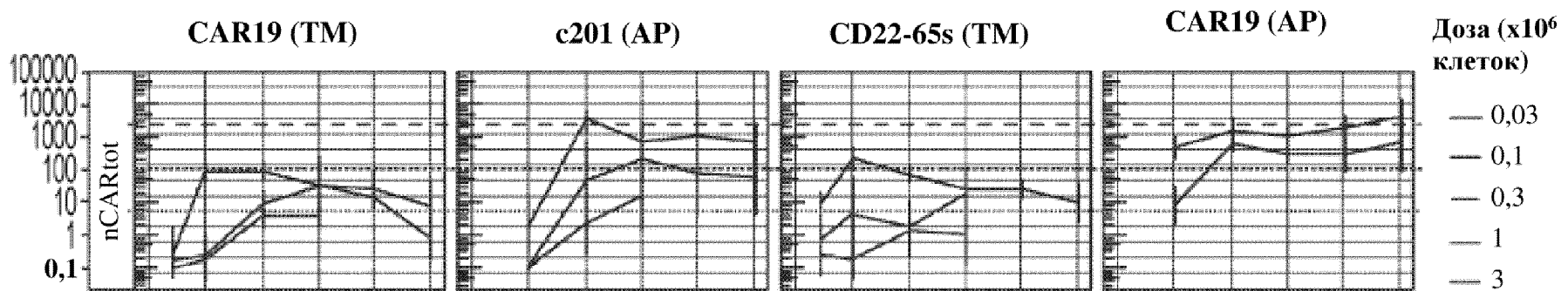
Фиг. 6А



- CAR19 (TM)
- ▲— CD22-65s (TM)
- ▽— c201 (AP)
- ◆— CAR19 (AP)

Фиг. 6В





Фиг. 6С