

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044329**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.16</p> <p>(21) Номер заявки
201891641</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2017.01.10</p> | <p>(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ВАРИАНТ III РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

- | | |
|---|---|
| <p>(31) 62/281,533; 62/431,758</p> <p>(32) 2016.01.21; 2016.12.08</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2019.01.31</p> <p>(86) PCT/IB2017/050108</p> <p>(87) WO 2017/125830 2017.07.27</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)</p> <p>(72) Изобретатель:
Вон Ой Квань, Чоу Джойс Чин (US),
Дюссо Матильда Брюнхильда (FR),
Смит Джулианна, Джонсон Сейсу
Барбра (US)</p> <p>(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)</p> | <p>(56) WO-A1-2014130657
JIANFENG HAN ET AL.: "CAR-Engineered NK Cells Targeting Wild-Type EGFR and EGFRvIII Enhance Killing of Glioblastoma and Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 5, 9 July 2015 (2015-07-09), page 11483, XP55201968, DOI: 10.1038/srep11483 abstract p. 2, 3rd, p. 2, last - p. 3, 1st, p. 4, last - p. 5, last, p. 7, last, p. 10, 4th
WO-A2-2014011988
B. PHILIP ET AL.: "A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy", BLOOD, vol. 124, no. 8, 21 August 2014 (2014-08-21), pages 1277-1287, XP55229811, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2014-01-545020 abstract p. 1278 col. 1, 1st, p. 1278 col. 1, 3rd, p. 1279 col. 2, last, p. 1282 col. 2, last, p. 1283, col. 1 li. 15-16
WO-A1-2012138475
WO-A2-2015092024
WO-A1-2016016341</p> |
|---|---|

- (57) Изобретение обеспечивает химерные антигенные рецепторы (CAR), которые специфически связываются с EGFRvIII (вариантом III рецептора эпидермального фактора роста). Изобретение дополнительно относится к сконструированным иммунным клеткам, содержащим такие CAR, нуклеиновым кислотам, кодирующим CAR, и способам их получения, сконструированным иммунным клеткам, нуклеиновым кислотам. Изобретение дополнительно относится к терапевтическим способам применения этих CAR и сконструированным иммунным клеткам для лечения EGFRvIII-опосредованных патологий, включая злокачественные новообразования, такие как глиобластома.

B1**044329****044329 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR). CAR способны перенацеливать специфичность иммунных клеток и реактивность на выбранную мишень, развивающую свойства лиганд-связывающего домена. В особенности, изобретение относится к CAR, которые специфически связываются с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII специфические CAR). Изобретение дополнительно относится к полинуклеотидам, кодирующим EGFRvIII специфические CAR, и выделенным клеткам, экспрессирующим EGFRvIII специфические CAR на их поверхности. Изобретение дополнительно относится к способам конструирования иммунных клеток, экспрессирующих EGFRvIII специфические CAR на их поверхности. Изобретение особенно пригодно для лечения солидных опухолей, таких как мультиформная глиобластома (GBM), мелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак яичников и рак предстательной железы. Изобретение дополнительно относится к иммунным клеткам, содержащим EGFRvIII специфические CAR (EGFRvIII специфические CAR-T клетки), композициям, содержащим EGFRvIII специфические CAR-T клетки, и способам применения EGFRvIII специфических CAR-T клеток для лечения EGFRvIII-опосредованных патологий.

Предпосылки создания изобретения

EGFR вариант III (EGFRvIII), опухолеспецифический мутант EGFR, является продуктом перестройки генома, который часто связан с амплификацией гена EGFR дикого типа. EGFRvIII образуется путем делеции внутри рамки считывания экзонов 2-7, что приводит к делеции 267 аминокислот с замещением глицина на стыке. Усеченный рецептор теряет свою способность связывать лиганды, но получает конститутивную киназную активность. Интересным является тот факт, что EGFRvIII всегда совместно ко-экспрессируется с полноразмерным EGFR дикого типа в одних и тех же опухолевых клетках.

Кроме того, клетки, экспрессирующие EGFRvIII, проявляют повышенную пролиферацию, инвазию, ангиогенез и резистентность к апоптозу.

EGFRvIII наиболее часто обнаруживают при мультиформной глиобластоме (GBM). Согласно имеющимся оценкам 25-35% GBM несет его усеченные рецепторы. Кроме того, его экспрессия отражает более агрессивный фенотип и плохой прогноз. Кроме GBM, экспрессия EGFRvIII также была описана при других солидных опухолях, таких как мелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак яичников и рак предстательной железы. И наоборот, EGFRvIII не экспрессируется в здоровых тканях. Отсутствие экспрессии в нормальных тканях делает EGFRvIII идеальной мишенью для разработки опухолеспецифической нацеленной терапии.

Адоптивный перенос Т-клеток, генетически модифицированных для распознавания антигенов, связанных со злокачественными новообразованиями, показал перспективы в качестве нового подхода для лечения злокачественного новообразования (см., например, Brenner и др., *Current Opinion in Immunology*, 22(2): 251-257 (2010); Rosenberg и др., *Nature Reviews Cancer*, 8(4): 299-308 (2008)). Т-клетки могут быть генетически модифицированы таким образом, чтобы экспрессировать химерные антигенные рецепторы (CAR), которые представляют собой слитые белки, состоящие из компонента, распознающего антиген, и доменов, активирующих Т-клетки (см., например, Eshhar и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(2): 720-724 (1993), и Sadelain и др., *Curr. Opin. Immunol*, 21(2): 215-223 (2009)). Таким образом, лечение солидных опухолей, таких как мультиформная глиобластома, с использованием анти-EGFRvIII антагониста, включая EGFRvIII специфические CAR и EGFRvIII специфические CAR-T клетки, будет являться перспективным терапевтическим агентом. Краткое изложение сущности изобретения

Обеспечиваются химерные антигенные рецепторы (CAR), которые связываются с EGFRvIII. Показано, что определенные EGFRvIII специфические CAR являются эффективными, когда экспрессируются в Т-клетках для активации Т-клеток при контактировании с EGFRvIII. Благоприятно, обеспечиваемые в настоящем изобретении EGFRvIII специфические CAR связывают EGFRvIII человека. Также благоприятно, обеспечиваемые в настоящем изобретении EGFRvIII специфические CAR-T клетки проявляют дегранулирующую активность, повышают продукцию гамма-интерферона, и/или цитотоксическую активность при контактировании с клетками, экспрессирующими EGFRvIII.

В одном аспекте, изобретение обеспечивает EGFRvIII специфический CAR, содержащий внеклеточный лиганд-связывающий домен, первый трансмембранный домен, и внутриклеточный сигнальный домен, где внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит (а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую (I) VH гипервариабельную область один (CDR1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62, 63, 64, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 109, 110, 111, 115, 116, 117, 121, 122, 123, 137, 138, или 139; (II) VH CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, 71, 77, 78, 83, 84, 86, 87, 91, 92, 112, 113, 118, 119, 124, 125, 127, 128, 140, или 141; и (III) VH CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, 79, 85, 114, 120, 126, 129, или 142, и/или (б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую (I) VL CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 149, 156, 159, 162, 165, 182, 185, 187, или 195; (II) VL CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 152, 157, 160, 163, 183, 186, 188, или 196; и (III) VL CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 153, 158, 161, 164, 184, 189, или 197.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает EGFRvIII специфический CAR, содержащий внекле-

точный лиганд-связывающий домен, первый трансмембранный домен, и внутриклеточный сигнальный домен, где внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит одноцепочечный Fv фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую три CDR из VH области, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15, 37, 39, 41, 43, или 48; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую три CDR из VL области, содержащие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 10, 12, 14, 16, 38, 40, 42, или 49. В некоторых вариантах осуществления, VH область может содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15, 37, 39, 41, 43, или 48, или ее вариант с одной или несколькими консервативными аминокислотными заменами в участках, которые не находятся в пределах CDR, и/или VL участок может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 10, 12, 14, 16, 38, 40, 42, или 49, или ее вариант с одной или несколькими аминокислотными заменами в аминокислотах, которые не находятся в пределах CDR. Например, в некоторых вариантах осуществления, VH или VL область из scFv может содержать аминокислотную последовательность, описанную выше, или ее вариант с не более, чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, или 1 консервативными заменами в участках, которые не находятся в пределах CDR.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение обеспечивает EGFRvIII специфический CAR, содержащий внеклеточный лиганд-связывающий домен, первый трансмембранный домен, и внутриклеточный сигнальный домен, где внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит одноцепочечный Fv фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, 15, 30, 37, или 41; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, 16, 31, 38, или 42. В некоторых вариантах осуществления, VH содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и VL содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления, VH содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и VL содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления, VH содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, и VL содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления, VH содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и VL содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления, VH содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и VL содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит CD3zeta сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит 4-1BB сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, CAR может дополнительно содержать второй внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, второй внутриклеточный сигнальный домен может содержать 4-1BB сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления первый внутриклеточный сигнальный домен содержит CD3zeta сигнальный домен и второй внутриклеточный сигнальный домен содержит 4-1BB сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления, CAR может содержать стволовой домен между внеклеточным лиганд-связывающим доменом и первым трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления, стволовой домен может быть выбран из группы, включающей: CD8 α петлю человека, CD28 петлю человека, IgG1 петлю, и Fc γ RIII α петлю.

В некоторых вариантах осуществления, первый трансмембранный домен может содержать трансмембранный домен цепи CD8 α .

В некоторых вариантах осуществления, CAR может содержать другой внеклеточный лиганд-связывающий домен, который не является специфическим для EGFRvIII.

В некоторых вариантах осуществления CAR, внеклеточный(е) лиганд-связывающий(е) домен(ы), первый трансмембранный домен, и внутриклеточный(е) сигнальный(е) домен(ы) находятся на одном полипептиде.

В некоторых вариантах осуществления, CAR может содержать второй трансмембранный домен, где первый трансмембранный домен и внеклеточный(е) лиганд-связывающий(е) домен(ы) находятся на первом полипептиде, и где второй трансмембранный домен и внутриклеточный(е) сигнальный(е) домен(ы) находятся на втором полипептиде, где первый трансмембранный домен содержит трансмембранный домен из α цепи IgE рецептора с высокой аффинностью (Fc ϵ RI) и второй трансмембранный домен содержит трансмембранный домен из γ или β цепи Fc ϵ RI. В некоторых вариантах осуществления, CAR может содержать третий полипептид, содержащий третий трансмембранный домен, слитый с внутриклеточным сигнальным доменом из костимулирующей молекулы, где третий трансмембранный домен содержит трансмембранный домен из γ или β цепи Fc ϵ RI.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую EGFRvIII специфический CAR, как описано в настоящем изобретении.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную

последовательность, кодирующую EGFRvIII специфическое CAR антитело, как описано в настоящем изобретении.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает сконструированную иммунную клетку, экспрессирующую на ее наружной клеточной мембране EGFRvIII специфические CAR, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, сконструированная иммунная клетка может содержать другой CAR, который не является специфическим для EGFRvIII.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированная иммунная клетка может содержать полинуклеотид, кодирующий суицидный полипептид. В некоторых вариантах осуществления, суицидный полипептид представляет собой RQR8. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий суицидный полипептид, находится в другой молекуле нуклеиновой кислоты, чем полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую EGFRvIII специфический CAR. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий суицидный полипептид, является частью той же молекулы нуклеиновой кислоты, что и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую EGFRvIII специфический CAR.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированная иммунная клетка, содержащая EGFRvIII-специфический CAR, может содержать суицидный полипептид в отдельной полипептидной цепи из полипептидной цепи EGFRvIII-специфического CAR.

В некоторых вариантах осуществления, EGFRvIII специфический CAR, как описано в настоящем изобретении, также содержит суицидный полипептид в одной и той же полипептидной цепи, что и CAR. Например, суицидный полипептид может находиться между scFv и петлевой последовательностью CAR. В некоторых вариантах осуществления, суицидный полипептид в CAR может иметь R2 формат, как обеспечивается в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, суицидный полипептид содержит эпитоп, который распознается ритуксимабом.

Также в настоящем изобретении обеспечивается полинуклеотид, кодирующий EGFRvIII специфический CAR, который также кодирует суицидный полипептид в CAR.

В некоторых вариантах осуществления, иммунная клетка может иметь происхождение из воспалительного Т-лимфоцита, цитотоксического Т-лимфоцита, регуляторного Т-лимфоцита, Т-лимфоцита памяти, хелперного Т-лимфоцита, естественного Т-лимфоцита киллера, или естественной клетки-киллера.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированная иммунная клетка может содержать разрушение в одном или нескольких эндогенных генах, где эндогенный ген кодирует TCR α , TCR β , CD52, глюкокортикоидный рецептор (GR), дезоксицитидин киназу (dCK), или белок иммунной контрольной точки, такой как, например, запрограммированная гибель-1 (PD-1).

В некоторых вариантах осуществления, иммунную клетку получают от здорового донора. В некоторых вариантах осуществления, иммунную клетку получают от пациента.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает сконструированную иммунную клетку, экспрессирующую на ее наружной клеточной мембране EGFRvIII специфические CAR, как описано в настоящем изобретении для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство предназначено для применения для лечения злокачественного новообразования, связанного с EGFRvIII, (например, любое злокачественное новообразование с EGFRvIII экспрессией) выбранного из группы, включающей мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, гигантоклеточную глиобластому, глиосаркому, анапластическую олигодендроглиому, анапластическую эпендимому, анапластическую олигоастроцитому, карциному хориоидного сплетения, анапластическую ганглиоглиому, пинеобластому, пинеоцитому, менингиому, медуллоэпителиому, эпендимобластому, медуллобластому, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль, смешанную глиому, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, медуллобластому, рак ободочной и прямой кишки, рак анального канала, рак шейки матки, рак почки, рак кожи, рак поджелудочной железы, рак печени, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак щитовидной железы, мезотелиому, рак матки, лимфому и лейкоз.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает способ конструирования иммунной клетки, включающий: обеспечение иммунной клетки; и экспрессирование на поверхности клетки по меньшей мере одного EGFRvIII специфического CAR, как описано в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает: обеспечение иммунной клетки; интродуцирование в клетку по меньшей мере одного полинуклеотида, кодирующего указанный EGFRvIII специфический CAR; и экспрессирование указанного полинуклеотида в клетке.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает обеспечение иммунной клетки; интродуцирование в клетку по меньшей мере одного полинуклеотида, кодирующего указанный EGFRvIII специфический CAR; и интродуцирование по меньшей мере одного другого CAR, который не является специфическим для EGFRvIII.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, страдающего от состояния, связанного со злокачественными клетками, где способ включает: обеспечение иммунной клетки, экспрессирующей на поверхности EGFRvIII специфический CAR, как описано в настоящем изобретении; и

введение указанных иммунных клеток указанному пациенту.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую сконструированную иммунную клетку, как описано в настоящем изобретении.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает способ лечения состояния, связанного со злокачественными клетками, экспрессирующими EGFRvIII, у субъекта, включающий введение субъекту, который в этом нуждается, эффективного количества фармацевтической композиции по пункту, содержащей сконструированную иммунную клетку, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование, связанное с EGFRvIII, выбранное из группы, включающей мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, гигантоклеточную глиобластому, глиосаркому, анапластическую олигодендроглиому, анапластическую эпендимому, анапластическую олигоастроцитому, карциному хориоидного сплетения, анапластическую ганглиоглиому, пинеобластому, пинеоцитому, менингиому, медуллоэпителиому, эпендимобластому, медуллобластому, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль, смешанную глиому, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, медуллобластому, рак ободочной и прямой кишки, рак анального канала, рак почки, рак шейки матки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак щитовидной железы, мезотелиому, рак матки и рак мочевого пузыря.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает способ ингибирования роста или прогрессирования опухоли у субъекта, который имеет злокачественные клетки, экспрессирующие EGFRvIII, включающий введение субъекту, который в этом нуждается, эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей сконструированную иммунную клетку, как описано в настоящем изобретении.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает способ ингибирования метастазирования злокачественных клеток, экспрессирующих EGFRvIII, у субъекта, включающий введение субъекту, который в этом нуждается, эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей сконструированную иммунную клетку, как описано в настоящем изобретении.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает способ индуцирования регрессии опухоли, у субъекта, который имеет злокачественные клетки, экспрессирующие EGFRvIII, включающий введение субъекту, который в этом нуждается, эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей сконструированную иммунную клетку, как описано в настоящем изобретении.

Краткое описание фигур/рисунков

На фиг. 1A, фиг. 1B, и фиг. 1C представлены примеры FACS гистограмм связывания трех EGFRvIII антител: mAb 42G9 (фиг. 1A), 32A10 (фиг. 1B) и 32G8 (фиг. 1C), с тремя F98 клеточными линиями: F98 (EGFR отрицательная), F98-EGFRwt, и F98-EGFRvIII. На оси X представлена интенсивность флуоресценции; на оси Y представлен процент максимального/нормированного к модальному значению.

На фиг. 2A представлен столбчатый график, в котором обобщена EGFRvIII специфическая CAR экспрессия для CAR, содержащих различные EGFRvIII специфические клоны.

На фиг. 2B представлен столбчатый график, в котором обобщен процент EGFRvIII специфических CAR T клеток, которые связаны с рекомбинантным EGFR-mFc и EGFRvIII-mFc.

На фиг. 2C представлен столбчатый график, в котором обобщена экспрессия CAR, содержащих 10 различных EGFRvIII специфических клонов в CAR T клетках.

На фиг. 3 представлен столбчатый график, в котором обобщены активности дегранулирования EGFRvIII специфических CAR T клеток, экспрессирующих различные EGFRvIII специфические клоны, отдельно или при совместном культивировании с различными клеточными линиями: клетки, которые не экспрессируют какой-либо EGFR белок (NCI-H522 и U87-KO), клетки экспрессируют высокий уровень EGFR дикого типа (U87-KO-EGFRwt), или клетки, которые экспрессируют низкий (NCI-H522-EGFRvIII) и высокий (U87-KO-EGFRvIII) уровни EGFRvIII.

На фиг. 4 представлен столбчатый график, в котором обобщена IFN γ секреция с помощью EGFRvIII специфических CAR T клеток, экспрессирующих различные EGFRvIII специфические клоны, отдельно или при совместном культивировании с различными клеточными линиями: клетки, которые не экспрессируют какой-либо EGFR белок (NCI-H522 и U87-KO), клетки экспрессируют высокий уровень EGFR дикого типа (U87-KO-EGFRwt), или клетки, которые экспрессируют низкий (NCI-H522-EGFRvIII) и высокий (U87-KO-EGFRvIII) уровни EGFRvIII.

На фиг. 5 представлен столбчатый график сравнения цитотоксичности EGFRvIII специфических CAR T клеток, экспрессирующих различные EGFRvIII специфические клоны, по отношению к клеточной линии, экспрессирующей EGFR дикого типа (U87-KO-EGFRwt) относительно высокой (U87-KO-EGFRvIII) и низкой EGFRvIII (NCI-H522-EGFRvIII) экспрессирующих клеточных линий.

На фиг. 6 представлен график, в котором обобщены противоопухолевые активности EGFRvIII специфических CAR T клеток, экспрессирующих различные EGFRvIII специфические клоны по отношению к GBM клеткам на подкожной GBM модели ксенотрансплантата.

На фиг. 7 представлен столбчатый график, в котором обобщена CAR экспрессия с помощью CAR T клеток, экспрессирующих четыре различных EGFRvIII специфических клонов в CAR и несущих интра-

CAR суицидную последовательность R2 в CAR в День 4, День 9/10, и День 14/15 после трансдукции Т-клеток.

На фиг. 8 представлен столбчатый график, в котором обобщена CAR экспрессия с помощью CAR Т клеток, экспрессирующих четыре различных EGFRvIII специфические клоны в CAR и несущих интра-CAR суицидную последовательность R2 в День 4 и День 14/15 после трансдукции Т-клеток.

На фиг. 9 представлен столбчатый график, в котором обобщена цитотоксичность CAR Т клеток, экспрессирующих четыре различных EGFRvIII специфические клоны и несущих интра-CAR суицидную последовательность R2 по отношению к клеточной линии, экспрессирующей высокие уровни (U87-KO-EGFRvIII) и низкие уровни EGFRvIII (NCI-H522-EGFRvIII).

Подробное описание

Изобретение, раскрытое в настоящем изобретении, обеспечивает химерные антигенные рецепторы (CAR) и иммунные клетки, содержащие CAR (например CAR-Т клетки), которые специфически связываются с EGFRvIII (например, humEGFRvIII). Изобретение также обеспечивает полинуклеотиды, кодирующие эти CAR, композиции, содержащие эти CAR-Т клетки, и способы получения и применения этих CAR и CAR-Т клеток. Изобретение также обеспечивает способы лечения состояния, связанного с EGFRvIII-опосредованными патологиями, у субъекта, такого как злокачественное новообразование.

Общие методики

При осуществлении изобретения будут применяться, если специально не указано иначе, общепринятые техники молекулярной биологии (включая рекомбинантные техники), микробиологии, клеточной биологии, биохимии, иммунологии, вирусологии, создания и конструирования моноклональных антител, которые известны для квалифицированного специалиста в данной области техники. Такие техники подробно раскрыты в литературе, такой как, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, второе издание (Sambrook и др., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ред., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ред., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ред., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, ред., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, ред.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, ред., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel и др., ред., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis и др., ред., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan и др., and., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ред., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, ред., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J.D. Capra, ред., Harwood Academic Publishers, 1995).

Определения

Термин "внеклеточный лиганд-связывающий домен" как используется в настоящем изобретении, относится к олиго- или полипептиду, который способен связываться с лигандом. Предпочтительно, домен способен взаимодействовать с молекулой на клеточной поверхности. Например, внеклеточный лиганд-связывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда, который действует в качестве маркера клеточной поверхности на клетки-мишени, связанные с конкретным болезненным состоянием.

Термин "стволовой домен" или "петлевой домен", которые используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении, относятся к любому олиго- или полипептиду, которые функционируют для связывания трансмембранного домена с внеклеточным лиганд-связывающим доменом. В особенности, стволые домены используются для обеспечения большей гибкости и доступности для внеклеточного лиганд-связывающего домена.

Термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к части белка, которая передает эффекторный функциональный сигнал и направляет клетки для осуществления специализированной функции.

"Костимулирующая молекула", как используется в настоящем изобретении, относится к родственному связывающему партнеру на Т клетке, который специфически связывается к ко-стимулирующим лигандом, опосредуя таким образом ко-стимулирующую ответную реакцию с помощью клетки, такую как, но не ограничиваясь только ими, пролиферацию. Костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваясь только ими, к молекуле МНС класса I, BTLA и рецептор Toll-лиганда. Примеры костимулирующих молекул включают CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83 и другие.

"Ко-стимулирующий лиганд" относится к молекуле на антиген-презентирующей клетке, которая специфически связывает родственную ко-стимулирующую сигнальную молекулу на Т клетке, таким образом обеспечивая сигнал, который, дополнительно к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием TCR/CD3 комплексом, с МНС молекулой, загруженной на пептиде, опосредует Т-клеточный ответ, включая, но не ограничиваясь только ими, активацию пролиферации, дифференциации, продукции цитокинов и другие. Ко-стимулирующий лиганд может включать, но не ограничиваясь только

ими, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина β , 3/TR6, ILT3, ILT4, антагонист или антитело, которое связывает рецептор Toll-лиганда и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Ко-стимулирующий лиганд также охватывает, в частности, антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулы, презентированной на Т-клетке, такой как, но не ограничиваясь только ими, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83.

"Антитело" представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид, и др., с помощью по меньшей мере одного антиген-распознающего сайта, расположенного на вариабельном участке молекулы иммуноглобулина. Как используется в настоящем изобретении, термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их антиген-связывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) и домены антитела (включая, например, акулы и верблюжьих антитела), и слитые белки, содержащие антитело, и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которые содержат сайт распознавания антигена. Антитело включает антитело любого класса, такого как IgG, IgA, или IgM (или их подкласса), и антитело не обязательно должно быть любого предпочтительного класса. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области его тяжелых цепей антитела, иммуноглобулины могут быть разделены на различные классы. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG, и IgM, и некоторые из них могут быть разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначаются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов известны.

Термин "антиген-связывающий фрагмент" или "антиген-связывающая часть" антитела, как используется в настоящем изобретении, относится к одному или нескольким фрагментам интактного антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с данным антигеном (например, EGFRvIII). Антиген-связывающие функции антитела могут осуществляться фрагментами интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антиген-связывающий фрагмент" антитела, включают Fab; Fab'; F(ab')₂; Fd фрагмент, состоящий из VH и CH1 доменов; Fv фрагмент, состоящий из VL и VH доменов одноплечевого антитела; однодоменное антитело (dAb) фрагмент (Ward и др., Nature 341:544-546, 1989), и выделенную гипервариабельную область (CDR).

Антитело, конъюгат антитела или полипептид, который "предпочтительно связывает" или "специфически связывает" (используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении) мишень (например, EGFRvIII белок) представляет собой термин, хорошо известный в данной области техники, и способы определения такого специфического или предпочтительного связывания также хорошо известны в данной области техники. Молекула считается такой, которая проявляет "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание", если она взаимодействует или ассоциируется более часто, более быстро, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретной клеткой или веществом, чем она проявляет с альтернативными клетками или веществами. Антитело "специфически связывает" или "предпочтительно связывает" с мишенью, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко, и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, антитело, которое специфически или предпочтительно связывается с EGFRvIII эпитопом, представляет собой антитело, которое связывает этот эпитоп с большей аффинностью, авидностью, более легко, и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими EGFRvIII эпитопами или не-EGFRvIII эпитопами. Также подразумевается, что при прочтении этого определения, например, антитело (или часть или эпитоп), которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. Как таковое, "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание" не обязательно требует (хотя оно может включать) исключительное связывание. Обычно, но не обязательно, ссылка на связывание обозначает предпочтительное связывание.

"Вариабельная область" антитела обозначает вариабельную область легкой цепи антитела или вариабельную область тяжелой цепи антитела, либо отдельно или в комбинации. Как известно в данной области техники, вариабельные области тяжелой и легкой цепи каждая состоит из четырех каркасных областей (FR), соединенных с помощью трех гипервариабельных областей (CDR) также известные как участки, определяющие комплементарность. CDR в каждой цепи удерживаются совместно в непосредственной близости с помощью FR и, с CDR из другой цепи, что способствует образованию антиген-связывающего сайта антител. Существует по меньшей мере две техники для определения CDR: (1) подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей (то есть Kabat и др. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al-lazikani и др., 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948). Как используется в настоящем изобретении, CDR может относиться к

CDR, определенных с помощью любого подхода или путем комбинации обоих подходов.

"CDR" варибельного домена представляет собой аминокислотные остатки в пределах варибельной области, которые идентифицированы в соответствии с определениями Kabat, Chothia, аккумуляцией обоих Kabat и Chothia, AbM, контакта, и/или конформационных определений или любого метода определения CDR, хорошо известного в данной области техники. CDR антител могут быть идентифицированы в качестве гиперварибельных областей, изначально определенных с помощью Kabat и др. См., например, Kabat и др., 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Положения CDR также могут быть идентифицированы с помощью структур структурной петли, исходно определенных Chothia и другими. См., например, Chothia и др., *Nature* 342:877-883, 1989. Другие подходы к идентификации CDR включают "AbM определение", которое является компромиссным между Kabat и Chothia и его получают, используя программное обеспечение для моделирования антитела Oxford Molecular's AbM (сейчас Accelrys®), или "контактное определение" CDR на основании наблюдаемых контактов антигена, как указано в MacCallum и др., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745, 1996. В другом подходе, обозначаемом в настоящем изобретении как "конформационное определение" CDR, положения CDR могут быть идентифицированы в качестве остатков, которые энталпически значимы для связывания антигена. См., например, Makabe и др., *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166, 2008. Также еще другие определения границ CDR могут не жестко придерживаться одного из вышеописанных подходов, но, тем не менее, будет перекрываться с по меньшей мере частью Kabat CDR, хотя они могут быть более короткими или удлиненными в свете предсказаний или экспериментальных данных, что конкретные остатки или группы остатков или даже полностью CDR не будут оказывать существенного влияния на связывание антигена. Как используется в настоящем изобретении, CDR может относиться к CDR, определенным с помощью любого подхода, известного в данной области техники, включая комбинацию подходов. В способах, используемых в настоящем изобретении, могут применяться CDR, определенные в соответствии с любым из этих подходов. Для любого данного варианта осуществления, содержащего более одной CDR, CDR может определяться в соответствии с любыми определениями Kabat, Chothia, распространенными, AbM, контактными, и/или конформационными определениями.

Как используется в настоящем изобретении, "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, содержащиеся в популяции, являются идентичными за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в небольших количествах.

Моноклональные антитела являются высоко специфическими, нацеленными на единственный антигенный сайт. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, нацеленные на разные детерминанты (эпитопы), каждое моноклональное антитело нацелено на единственную детерминанту на антигене. Модификатор "моноклональное" указывает на характеристику антитела, что оно было получено из по существу гомогенной популяции антител, и не должно истолковываться как требующее получения антитела с помощью любого предпочтительного метода. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с изобретением, могут быть получены с помощью гибридомного метода, впервые описанного Kohler и Milstein, *Nature* 256:495, 1975, или могут быть получены с помощью методов рекомбинантных ДНК, таких как описано в патенте США № 4,816,567. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек, используя техники, описанные в McCafferty и др., *Nature* 348:552-554, 1990, например.

Как используется в настоящем изобретении, "гуманизованное" антитело относится к формам нечеловеческих (например, мышинных) антител, которые представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов, или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антиген-связывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, имеющую происхождение из нечеловеческого иммуноглобулина. Предпочтительно, гуманизованное антитело представляет собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в котором остатки из гиперварибельной области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR нечеловеческих видов (донорное антитело), таких как мышь, крыса или кролик, имеющих желательную специфичность, аффинность и способность. В некоторых случаях, остатки Fv каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизованное антитело может содержать остатки, которые не были обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированных CDR или каркасных последовательностях, но их включают для дальнейшей очистки и производительности антитела. В целом, гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, и типично двух, варибельных доменов, в котором все или по существу все из CDR участков соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина и все или по существу все из FR участков представляют собой таковые консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизованное антитело оптимально также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина или домена (Fc), типично таковую иммуноглобулина человека. Предпочтительными являются антитела, имеющие Fc-области, модифицированные, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизованных антител имеют одну или несколько CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, или CDR H3), которые изменены по отношению к исходному антителу, которые также

обозначаются как одна или несколько CDR, "имеющих происхождение из" одной или нескольких CDR из исходного антитела.

Как используется в настоящем изобретении, "антитело человека" обозначает антитело, имеющее аминокислотную последовательность, соответствующую таковой последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или которое было получено, используя любые из техник для приготовления антител человека, известных квалифицированным специалистам в данной области техники или, раскрытых в настоящем изобретении. Это определение антитела человека включает антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой цепи человека или по меньшей мере один полипептид легкой цепи человека. Одним из таких примеров является антитело, содержащее полипептиды мышинных легких цепей и человеческих тяжелых цепей. Антитела могут быть получены с использованием различных техник, известных в данной области техники. В одном варианте осуществления, антитело человека выбирают из фаговой библиотеки, где фаговая библиотека экспрессирует антитела человека (Vaughan и др., *Nature Biotechnology*, 14:309-314, 1996; Sheets и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381, 1991; Marks и др., *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991). Антитела человека также могут быть получены путем иммунизации животных, у которых локусы иммуноглобулинов человека были трансгенно интродуцированы вместо эндогенных локусов, например, мыши, у которых эндогенные гены иммуноглобулинов были частично или полностью инактивированы. Этот подход описан в патентах США №№ 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; и 5,661,016. Альтернативно, антитело человека может быть приготовлено путем иммортализации В лимфоцитов человека, которые продуцируют антитело, направленное на целевой антиген (такие В лимфоциты могут быть восстановлены из индивидуума или из клонирования кДНК единичной клетки, или могут быть иммунизированы *in vitro*). См., например, Cole и др. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, с. 77, 1985; Boerner и др., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95, 1991; и U.S. Pat. No. 5,750,373.

Термин "химерное антитело" обозначает антитела, в которых последовательности переменных областей имеют происхождение из одних видов, а последовательности константных областей имеют происхождение из других видов, например, антитело в котором последовательности переменных областей имеют происхождение из мышинного антитела, а последовательности константных областей имеют происхождение из антитела человека.

Термины "полипептид", "олигопептид", "пептид" и "протеин" используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении по отношению к аминокислотным цепям любой длины. Например, цепь может быть относительно короткой (например, 10-100 аминокислот), или более длинной. Цепь может быть линейной или разветвленной, она может содержать модифицированные аминокислоты, и/или может быть прервана не-аминокислотами. Термины также охватывают аминокислотную цепь, которая была модифицирована природно или путем вмешательства; например, образование дисульфидных связей, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование или любая другая манипуляция или модификация, такая как конъюгирование с меченым компонентом. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (включая, например, не встречающиеся в природе аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Подразумевается, что полипептиды могут встречаться в виде одноцепочечных или ассоциированных цепей.

"Моновалентное антитело" содержит один антиген-связывающий сайт на молекулу (например, IgG или Fab). В некоторых случаях, моновалентное антитело может иметь более одного антиген-связывающего сайта, но сайты связывания являются из разных антигенов.

"Бивалентное антитело" содержит два антиген-связывающих сайта на молекулу (например, IgG). В некоторых случаях, два сайта связывания имеют аналогичные антигенные специфичности. Тем не менее, бивалентные антитела могут быть биспецифическими.

"Биспецифическое" или "двухспецифичное" представляет собой гибридное антитело, имеющее два различных антиген-связывающих сайта. Два антиген-связывающих сайта биспецифического антитела связываются с двумя различными эпитопами, которые могут локализоваться на одной и той же или различных белковых мишенях.

"Бифункциональное" представляет собой антитело, имеющее идентичные антиген-связывающие сайты (то есть идентичные аминокислотные последовательности) в двух плечах, но каждый сайт связывания может распознавать два различных антигена.

Антитела согласно изобретению могут продуцироваться, используя техники, хорошо известные в данной области техники, например, рекомбинантные технологии, технологии фагового дисплея, синтетические технологии или комбинации таких технологий или другие технологии, хорошо известные в данной области техники (см., например, Jayasena, S.D., *Clin. Chem.*, 45: 1628-50, 1999 и Fellouse, F.A., и др., *J. Mol. Biol.*, 373(4):924-40, 2007).

Как известно в данной области техники, "полинуклеотид," или "нуклеиновая кислота," которые используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении, относятся к цепям нуклеотидов любой длины, и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть инкорпорирован в цепь с помощью ДНК или РНК полимеразы. Полинуклеотид может содер-

жать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Если она присутствует, то модификация нуклеотидной структуры может осуществляться перед или после сборки цепи. Последовательность нуклеотидов может быть прервана с помощью не-нуклеотидных компонентов. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгирования с меченым компонентом. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы", замену одного или более встречающихся в природе нуклеотидов на аналог, внутринуклеотидные модификации, такие как, например, модификации с незаряженными связями (например, метил фосфонаты, фосфотриэстеры, фосфоамидаты, карбаматы и др.) и с заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и др.), которые содержат боковые компоненты, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизини др.), с интеркаляторами (например, акридин, псорален и др.), которые содержат хелаторы (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и др.), содержащие алкиляторы, с модифицированными связями (например, альфа аномерные нуклеиновые кислоты и др.), а также немодифицированные форма полинуклеотида(ов). Дополнительно, любые гидроксильные группы, изначально присутствующие в сахарах, могут быть защищены, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищенными стандартными защитными группами, или активированными для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или могут быть конъюгированы с твердыми подложками. 5' и 3' концевой ОН может быть фосфорилирован или замещенный аминами или органическими компонентами кэп-групп, содержащими 1-20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть дериватизированы до стандартных защитных групп. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы рибозных или дезоксирибозных Сахаров, которые обычно известны в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибоза, карбоциклические аналоги сахаров, альфа- или бета-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и аналоги нуклеозидов с удаленным азотистым основанием, например, метил рибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, но не ограничиваясь только ими, варианты осуществления, в которых фосфат заменен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формацеталь"), а которых каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий простую эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Необязательно, чтобы все связи в полинуклеотиде были идентичными. Предшествующее описание применяется ко всем полинуклеотидам, указанным в настоящем изобретении, включая РНК и ДНК.

Как известно в данной области техники, "константная область" антитела относится к константной области легкой цепи антитела или константной области тяжелой цепи антитела, либо отдельно или в комбинации.

Как используется в настоящем изобретении, "по существу чистый" относится к материалу, который является по меньшей мере на 50% чистым (то есть не содержат загрязняющих веществ), более предпочтительно, по меньшей мере 90% чистым, более предпочтительно, по меньшей мере 95% чистым, еще более предпочтительно, по меньшей мере 98% чистым, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 99% чистым.

"Клетка-хозяин" включает индивидуальную клетку или клеточную культуру, которая может представлять собой или была реципиентом для вектора(ов) для инкорпорации полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство единичной клетки-хозяина, и потомство не обязательно должно быть полностью идентичным (по морфологии или в геномном ДНК компоненте) к исходной родительской клетке благодаря природной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфектированные *in vivo* с помощью полинуклеотида(ов) согласно настоящему изобретению.

Как используется в настоящем изобретении, "иммунная клетка" относится к клетке гемопоэтического происхождения, вовлеченной в инициацию и/или реализацию врожденного и/или адаптивного иммунного ответа.

Как известно в данной области техники, термин "Fc-область" используется для определения C-концевого участка тяжелой цепи иммуноглобулина. "Fc-область" может представлять собой нативную последовательность Fc-области или вариант Fc-области. Несмотря на то, что границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут изменяться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно находится от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230, до его карбоксильного конца. Нумерация остатков в Fc-области соответствует EU - индексу, как в Kabat. Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. Fc-область иммуноглобулина обычно содержит две константные области, CH₂ и CH₃.

Как используется в данной области техники, "Fc рецептор" и "FcR" описывают рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительный FcR представляет собой нативную последовательность FcR человека. Кроме того, предпочтительный FcR представляет собой такой рецептор, который связывается с IgG антителом (гамма рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII, и

FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. FcγRII рецепторы включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся в большинстве случаев в их цитоплазматических доменах. Обзор FcR представлен в Ravetch и Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92, 1991; Capel и др., *Immunomethods*, 4:25-34, 1994; и de Haas и др., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41, 1995. "FcR" также включает неональный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer и др., *J. Immunol.*, 117:587, 1976; и Kim и др., *J. Immunol.*, 24:249, 1994).

Термин "конкурирует", как используется в настоящем изобретении по отношению к антителу, обозначает, что первое антитело, или его антиген-связывающий фрагмент (или часть), связывается с эпитопом образом, достаточно сходным со связыванием второго антитела, или его антиген-связывающей части, таким образом, что результат связывания первого антитела с его распознанным эпитопом явно снижается в присутствии второго антитела по сравнению со связыванием первого антитела при отсутствии второго антитела. Альтернативно, где связывание второго антитела с его эпитопом также явно снижается в присутствии первого антитела, может, но не обязательно иметь место. Иными словами, первое антитело может ингибировать связывание второго антитела с его эпитопом, что не сопровождается ингибированием вторым антителом связывания первого антитела с его соответствующим эпитопом. Тем не менее, если каждое антитело явно ингибирует связывание другого антитела с его распознанным эпитопом или лигандом, независимо от того, в аналогичной, большей или меньшей степени, то антитела являются "перекрестно-конкурирующими" друг с другом за связывание их соответствующего(их) эпитопа(ов). Как конкурирующие, так и перекрестно-конкурирующие антитела охватываются изобретением. Независимо от механизма, с помощью которого происходит такая конкуренция или перекрестная конкуренция (например, стерическое затруднение, конформационное изменение, или связывание с общим эпитопом или его частью), для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятным, на основании сведений, обеспечиваемых в настоящем изобретении, что такие конкурирующие и/или перекрестно-конкурирующие антитела охватываются и могут быть пригодными в способах, раскрытых в настоящем изобретении.

Как используется в настоящем изобретении, "аутологический" обозначает, что клетки, клеточную линию, или популяцию клеток, используемые для лечения пациентов, имеют происхождение от указанного пациента или от донора, совместимого по антигену лейкоцитов человека (HLA).

Как используется в настоящем изобретении, "аллогенный" обозначает, что клетки или популяция клеток, используемых для лечения пациентов, не имеет происхождения от указанного пациента, а от донора.

Как используется в настоящем изобретении, "лечение" представляет собой подход для получения благоприятных или желательных клинических результатов. Для целей настоящего изобретения, благоприятные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваясь только ими, один или несколько следующих: уменьшение пролиферации (или разрушение) неопластических или злокачественных клеток, ингибирование метастазирования неопластических клеток, сокращение или уменьшение размера опухоли, экспрессирующей EGFRvIII, ремиссию EGFRvIII ассоциированного заболевания (например, злокачественного новообразования), снижение симптомов, развивающихся вследствие EGFRvIII ассоциированного заболевания (например, злокачественного новообразования), повышение качества жизни тех, кто страдает от EGFRvIII ассоциированного заболевания (например, злокачественного новообразования), уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения EGFRvIII ассоциированного заболевания (например, злокачественного новообразования), замедление прогрессирования EGFRvIII ассоциированного заболевания (например, злокачественного новообразования), излечение EGFRvIII ассоциированного заболевания (например, злокачественного новообразования), и/или пролонгирование выживания пациентов, имеющих EGFRvIII ассоциированное заболевание (например, злокачественного новообразования).

"Облегчение" обозначает ослабевание или улучшение одного или более симптомов по сравнению с отсутствием введения EGFRvIII специфических CAR.

"Облегчение" также включает укорочение или уменьшение продолжительности симптомов.

Как используется в настоящем изобретении, "эффективная доза" или "эффективное количество" лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для получения любого одного или нескольких благоприятных или желательных результатов. Для профилактического применения, благоприятные или желательные результаты включают элиминирование или уменьшение риска, ослабление тяжести, или замедление начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, презентуемые во время развития заболевания. Для терапевтического применения, благоприятные или желательные результаты включают клинические результаты, такие как уменьшение распространения или ослабление одного или нескольких симптомов различных EGFRvIII ассоциированных заболеваний или состояний (таких как, например, мультиформная глиобластома), снижение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, усиление эффекта другого лекарственного средства, и/или замедление прогрессирования EGFRvIII ассоциирован-

ного заболевания у пациентов. Эффективная доза может вводиться за одно или несколько введений. Для целей настоящего изобретения, эффективная доза лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для осуществления профилактического или терапевтического лечения либо непосредственно или опосредованно. Как подразумевается в клиническом контексте, эффективная доза лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть достигнута совместно с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией или без них. Таким образом, "эффективная доза" может рассматриваться в контексте введения одного или нескольких терапевтических агентов, и единичный агент может рассматриваться для введения в таком эффективном количестве, если, в сочетании с одним или несколькими другими средствами, желательный результат может быть достигнут или достигнут.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающего, более предпочтительно, человека. Млекопитающие также включают, но не ограничиваясь только ими, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс.

Как используется в настоящем изобретении, "вектор" обозначает конструкт, который способен доставлять, и, предпочтительно, экспрессировать, один(у) или несколько генов или последовательностей, представляющих интерес, в клетке-хозяине. Примеры векторов включают, но не ограничиваясь только ими, вирусные векторы, оголенные ДНК или РНК экспрессионные векторы, плазмиду, космиду или фаговые векторы, ДНК или РНК экспрессионные векторы, ассоциированные с катионными конденсирующими средствами, ДНК или РНК экспрессионные векторы, инкапсулированные в липосомы, и определенные эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

Как используется в настоящем изобретении, "последовательность контроля экспрессии" обозначает нуклеотидную последовательность, которая направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты. Последовательность контроля экспрессии может представлять собой промотор, такой как конститутивный или индуцибельный промотор, или энхансер. Последовательность контроля экспрессии функционально связана с нуклеотидной последовательностью, подлежащей транскрипции.

Как используется в настоящем изобретении, "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый наполнитель" включает любой материал, который при комбинировании с активным компонентом, предоставляет возможность ингредиенту сохранять биологическую активность и не реагирует с иммунной системой хозяина. Примеры включают, но не ограничиваясь только ими, любые стандартные фармацевтические носители, такие как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии, такие как эмульсия масло-в-воде, и различные типы смачивающих реагентов. Предпочтительными разбавителями для аэрозольного или парентерального введения являются фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) или физиологический (0,9%) солевой раствор. Композиции, содержащие такие носители, готовят в виде препаратов с помощью хорошо известных общепринятых методов (см, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; и Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005).

Термин " k_{on} " или " k_a ", как используется в настоящем изобретении, относится к константе скорости ассоциации антитела с антигеном. Специфически, константы скорости (k_{on}/k_a и k_{off}/k_d) и равновесные константы диссоциации могут быть определены, используя, например, полноразмерные антитела и/или Fab фрагменты антител и соответствующий антиген.

Термин " k_{off} " или " k_d ", как используется в настоящем изобретении, относится к константе скорости диссоциации антитела от комплекса антитело/антиген.

Термин " K_D ", как используется в настоящем изобретении, относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия антитела-антиген.

Определения констант скорости ассоциации и диссоциации, k_{on} и k_{off} соответственно можно использовать биосенсор на основании поверхностного плазмонного резонанса для характеристики взаимодействия аналит/лиганд в условиях, где аналит является моновалентным по отношению к связыванию лиганда, который иммобилизуется при низкой способности на поверхность сенсора с помощью реагента захвата. Анализ осуществляют, используя методологию кинетического титрования, как описано в Karlsson и др., Anal. Biochem 349, 136-147, 2006. Сенсорный чип, реагент захвата и буфер для исследования, применяемые для данного анализа, выбирают для обеспечения стабильного захвата лиганда на поверхность сенсора, минимизации неспецифического связывания аналита к поверхностям, и получения аналит-связывающих ответных реакций, которые являются подходящими для кинетического анализа, согласно рекомендациям в Myszkа, J. Mol. Recognit 12, 279-284, 1999. Аналит-связывающие ответные реакции для взаимодействия аналит/лиганд имеют двойную ссылку и согласовываются с 1:1 "модель ограниченного переноса массы" Ленгмюра с k_a , k_d и R_{max} в качестве глобальных параметров, как описано в Myszkа & Morton и др., Biophys. Chem 64, 127-137 (1997). Равновесную константу диссоциации, K_D , выводят из соотношения кинетических констант скорости, $K_D = k_{off}/k_{on}$. Такие определения предпочтительно осуществляют при 25°C или 37°C.

Ссылка на "приблизительно" для значения или параметра в настоящем изобретении включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр per se. Например, описание со ссылкой "приблизительно X" включает описание "X." Области числовых значений ох-

ватывают числа, определяемые диапазоном. В общем случае, термин "приблизительно" относится к указанному значению переменной и ко всем значениям переменной, которые находятся в пределах экспериментальной погрешности указанного значения (например, в пределах 95% доверительного интервала для среднего значения) или в пределах 10 процентов указанного значения, в зависимости от того, который из них больше. Если термин "приблизительно" используется в контексте периода времени (годы, месяца, недели, дни и т.д.), термин "приблизительно" обозначает период времени плюс или минус одну величину следующего подчиненного периода времени (например, приблизительно 1 год обозначает 11-13 месяцев; приблизительно 6 месяцев обозначает 6 месяцев плюс или минус 1 неделю; приблизительно 1 неделя обозначает 6-8 дней и т.д.), или в пределах 10 процентов указанного значения, в зависимости от того, который из них больше.

Подразумевается, что во всех применимых случаях, когда варианты осуществления описываются в настоящем изобретении со словом "включающий," также обеспечиваются аналогичные варианты осуществления, описанные терминами "состоящие из" и/или "по сути состоящие из".

Если аспекты или варианты осуществления изобретения описаны с использованием группы Маркуша или другой группировки альтернатив, то изобретение охватывает не только всю группу, описанную как целое, но и каждого представителя группы индивидуально и все возможные подгруппы основной группы, а также основную группу, в которой отсутствуют один или больше групповых членов. Изобретение также предусматривает точное исключение одного или нескольких любых групповых членов в заявленном изобретении.

Если специально не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют такие же значения, что и обычно подразумеваются квалифицированным специалистом в области техники, к которой относится заявленное изобретение. В случае конфликта, настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущество. Для всего описания и пунктов формулы изобретения, слово "включает," или вариации, такие как "включают" или "включающий" будут предполагать включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключения любых других целых чисел или групп целых чисел. Если специально не следует из контекста, термины в единственном числе будут включать формы множественного числа и термины во множественном числе будут включать единственное число.

Примеры способов и материалов описанные в настоящем изобретении, хотя способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем описании, также могут использоваться при практическом осуществлении или тестировании изобретения. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и никоим образом не предназначены для ограничения.

EGFRvIII специфические CAR и способы их получения

Изобретение обеспечивает CAR, которые связываются с EGFRvIII (например, humEGFRvIII (например, SEQ ID NO: 201, номер доступа: P00533 идентификатор функции VAR_066493, или № доступа GenBank AJN69267)). EGFRvIII специфические CAR, обеспечиваемые в настоящем изобретении, включают одноцепочечные CARs и многоцепочечные CAR. CAR имеют способность перенаправлять специфичность и реакционную способность Т клеток на EGFRvIII образом, которые не ограничен МНС, разрабатывая антиген-связывающие свойства моноклональных антител. Не ограничиваемое МНС распознавание антигена обеспечивает Т клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген независимо от процессирования антигена, таким образом обходя основной механизм "ускользания" опухоли.

В некоторых вариантах осуществления, CAR обеспечиваемые в настоящем изобретении, содержат внеклеточный лиганд-связывающий домен (например, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv)), трансмембранный домен, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный лиганд-связывающий домен, трансмембранный домен, и внутриклеточный сигнальный домен находятся в одном полипептиде, то есть в одноцепочечном. Многоцепочечные CAR и полипептиды также обеспечиваются в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, многоцепочечные CAR содержат: первый полипептид, содержащий трансмембранный домен и по меньшей мере один внеклеточный лиганд-связывающий домен, и второй полипептид, содержащий трансмембранный домен и по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен, где полипептиды собираются вместе с образованием многоцепочечные CAR.

В некоторых вариантах осуществления, EGFRvIII специфические многоцепочечные CAR основываются на высокой аффинности рецептора для IgE (FcεRI). FcεRI, экспрессируемые на тучных клетках и базофилах, запускают аллергические реакции. FcεRI представляет собой тетрамерный комплекс, состоящий из одной α субъединицы, одной β субъединицы, и двух связанных дисульфидной связью γ субъединиц, α субъединица содержит IgE-связывающий домен. β и γ субъединицы содержат ITAM, которые опосредуют передачу сигналов. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен FcRα цепи удаляют и заменяют на EGFRvIII специфический внеклеточный лиганд-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, многоцепочечные EGFRvIII специфические CAR содержат scFv, который связывается специфически с EGFRvIII, CD8α петлей, и ITAM FcRP цепи. В некоторых вариантах осуществления, CAR может содержать FcRγ цепи или может ее не содержать.

В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит scFv, содержащий вариабельную область легкой цепи (VL) и вариабельную область тяжелой цепи (VH) целевого антиген-специфического моноклонального антитела, соединенного с помощью гибкого линкера. Фрагменты одноцепочечных вариабельных областей получают путем связывания вариабельных областей легкой и/или тяжелой цепи путем применения короткого пептидного линкера (Bird и др., Science 242:423-426, 1988). Примером линкерного пептида является GS линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGG)₄ (SEQ ID NO: 202), образует мост приблизительно 3,5 нм между карбоксильным концом одной вариабельной области и амино-концом другой вариабельной области. Были созданы и используются линкеры других последовательностей (Bird и др., 1988, выше). В целом, линкеры могут представлять собой короткие, гибкие полипептиды и предпочтительно содержат приблизительно 20 или меньше аминокислотных остатков. Линкеры, в свою очередь, могут быть модифицированы для придания дополнительных функций, например, присоединения лекарственных средств или присоединения твердых подложек. Одноцепочечные варианты могут быть получены либо рекомбинантно или синтетически. Для синтетического получения scFv, можно использовать автоматический синтезатор. Для рекомбинантной продукции scFv, подходящую плазмиду, содержащую полинуклеотид, который кодирует scFv, можно интродуцировать в подходящую клетку-хозяин, либо эукариотическую, такую как клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, или прокариотические, такие как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие scFv, представляющий, могут быть получены с помощью общепринятых манипуляций, таких как лигирование полинуклеотидов. Полученный scFv может быть выделен, используя стандартные техники очистки белка, известные в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит (а) VH область, содержащую (I) VH гипервариабельную область один (CDR1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62, 63, 64, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 99, 100, 101, 109, 110, 111, 115, 116, 117, 121, 122, 123, 132, 133, 134, 137, 138, 139, 143, 144, или 145; (II) VH CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, 66, 68, 69, 70, 71, 77, 78, 83, 84, 86, 87, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 105, 106, 112, 113, 118, 119, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 135, 136, 140, 141, 146, или 147; и (III) VH CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, 72, 73, 79, 85, 104, 107, 108, 114, 120, 126, 129, 142, или 148; и/или VL область, содержащую (I) VL CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 149, 154, 156, 159, 162, 165, 166, 168, 169, 170, 171, 173, 174, 176, 178, 181, 182, 185, 187, 190, 192, 195, или 198; (II) VL CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 150, 152, 155, 157, 160, 163, 172, 175, 179, 183, 186, 188, 191, 193, 196, или 199; и (III) VL CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151, 153, 158, 161, 164, 167, 177, 180, 184, 189, 194, 197, или 200. В некоторых вариантах осуществления, VH и VL связаны вместе с помощью гибкого линкера. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит (а) VH область, содержащую (I) VH гипервариабельную область один (CDR1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62, 63, 64, 74, 75, 76, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 109, 110, 111, 115, 116, 117, 121, 122, 123, 137, 138, или 139; (II) VH CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, 71, 77, 78, 83, 84, 86, 87, 91, 92, 112, 113, 118, 119, 124, 125, 127, 128, 140, или 141; и (III) VH CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, 79, 85, 114, 120, 126, 129, или 142, и/или (б) VL область, содержащую (I) VL CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 149, 156, 159, 162, 165, 182, 185, 187, или 195; (II) VL CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 152, 157, 160, 163, 183, 186, 188, или 196; и (III) VL CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 153, 158, 161, 164, 184, 189, или 197.

В другом аспекте, обеспечивается CAR, который специфически связывается с EGFRvIII, где CAR содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий: VH область, содержащую VH CDR1, VH CDR2, и VH CDR3 из VH последовательности, представленной на SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 30, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 43, 44, 46, 48, или 50; и/или VL область, содержащую VL CDR1, VL CDR2, и VL CDR3 из VL последовательности, представленной на SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 29, 31, 33, 36, 38, 40, 42, 45, 47, 49, или 51. В некоторых вариантах осуществления, VH и VL связаны вместе с помощью гибкого линкера. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, содержащий: VH область, содержащую VH CDR1, VH CDR2, и VH CDR3 из VH последовательности, представленной на SEQ ID NO: 5, 9, 11, 13, 15, 37, 39, 41, 43, или 48; и/или VL область, содержащую VL CDR1, VL CDR2, и VL CDR3 из VL последовательности, представленной на SEQ ID NO: 6, 10, 12, 14, 16, 38, 40, 42, или 49. В некоторых вариантах осуществления, VH и VL связаны вместе с помощью гибкого линкера. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления, CAR согласно изобретению содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, имеющий любую одну из частных последовательностей легких цепей, как

представлено в табл. 1, и/или любую одну из частных последовательностей тяжелых цепей, как представлено в табл. 1. В табл. 1, подчеркнутые последовательности представляют собой CDR последовательности в соответствии с Kabat и выделенные жирным шрифтом в соответствии с Chothia. Различные mAb из табл. 1 также могут обозначаться в настоящем изобретении как различные "клоны" анти-EGFRvIII антитела.

Таблица 1

mAb	Легкая цепь	Тяжелая цепь
m62G7	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWLLQRPQGSPKRLIYLV SKLDS GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVE AEDLGFYYC QDTHFPLT FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 2)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTF TDYTLHWVKQSHVKSLEWIGGIDPINGGT TYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLT SEDSAVYYC ARGEAMDS WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 1)
h62G7	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWFQQRPGQSPRRLIYLV SKLDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC QDTHFPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF TDYTLHWVRQAPGQGLEWMGGINPINGGT TYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYC ARGEAMDS WGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 3)
h62G7- L6/EQ	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWFQQRPGQSPRRLIYQV SKLDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC QDTHFPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF TDYTLHWVRQAPGQGLEWMGGIWPITGGT TYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYC GEAQQGS WGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 5)
h62G7- H14/L1 -DV	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQS LLYSNDKTYTN WFQQRPGQSPRRLIYEV SKLDV GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC QDTHFPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF TDYTLHWVRQAPGQGLEWMGGIWPITGGT TYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYC GEAEGS WGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 7)
42G9	EVVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQS VRSNLAWYQQKSGQAPRLLIYGSTIRAT GVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYSDWPF FGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 10)	QVTLKESGPVLLKPTETLTLTCTVSGFSL SNPRMGVSWIRQPPGKALEWFAHIFSTDE KSLKLSLRSRLTLSKDTSKSQVVLMTNM APVDSATYYCARD SSNYEGYDFD WGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 9)
32A10	EVVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQS VSSNF AWYQQRPQAPRLLLY GATTRAT GLPGRFSGSGSGTENILTISSLQSEDFAIYFC QQYKDWPF FGPGSKVDIK (SEQ ID NO: 12)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL SNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSTDE KSI RRSLRSRLTLSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD SSNYEGYFDY WGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 11)
20B9	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRVSQS IGANLAWYQQKFGQAPRLLIYGASTRAT GIPVRFSGGGSGTEFTLTISSLQSEDFAIYSC QQYIYWPF FGPGTVDIK (SEQ ID NO: 14)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL SNARMGVSWIRQPPGKALEWLGHIFSTDE KSY STSLRGRTISKDTSRGLVVLTLTNTM DPVDTATYYCARD SSNYEGYDFD WGPGFL LTVTVSS (SEQ ID NO: 13)
14C11	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQS VSN NLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRAT GVPARFSGSDSGTEFSLTISSLQSEDFAVYFC QQYKDWPF FGPGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL NNARMGVSWIRQPPGKALEWFAHIFSTDE KSF RTSLRSRLTLSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD SSNYEGYFDY WGQGL LTVTVSS (SEQ ID NO: 15)
21E11	DMVVTQSPATLSVSPGERATLSCRASQS VGSDLAWYQQPPGQSPRLLIYGASTRAT GVPARFSGSGSGTDFTLTITSLQSEDFAVYYC QQYNDWPF FGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 18)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL SNVRMGVSWIRQPPGKALEWFAHIFSSDE KSI RRSLRSRLTLSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD SSNYEGYDFD WGQGT LTVTVSSN (SEQ ID NO: 17)
49B11	EMEVTSQSPATLSVSPGERATLSCRASQN IGSDLAWYQQQSGQAPRLLISGASTRAT GVPTRFSGSGSGTDFTLTITSLQSEDFAVYYC QQYNDWPF FGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 20)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL SNVRMGVSWIRQPPGKALEWFAHIFSSDE KSI RRSLRSRLTLSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD SSNYEGYFDY WGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 19)

46E10	EVVMTQSPPNLSVSPGERATLS SCRASQS VTSNFAWY QQRPGQSPRLLLY GASTRAT GVPGRFSGSGSGTENILTISSLQSEDFA VYFC QQYKDWPF TFGPGSKVDIK (SEQ ID NO: 22)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSG FSL SNARMGVS WIRQPPGKALEWLA HIFSTDE KSI RRSLRSRLTLSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD DSSNYEGYFDY WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 21)
12H6	EVVMTQSPATLSVSPGERATLS SCRASQG VSSNFAWY QQRPGQSPRLLLY GASTRAT GVPGRFSGSGSGTENILTISSLQSEDFA IYFC QQYKDWPF TFGPGSKVDIK (SEQ ID NO: 24)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSG FSL SNARMGVS WIRQPPGKALEWLA HIFSTDE KSI RRSLRSRLTLSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD DSSNYEGYFDY WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 23)
19A9	EVVMTQSPATLSVSPGERATLS SCRASQS VNRNLAWY QQKPGQAPRLLI FGTSTRAT GIPARFSGSGSGTEFTLTIDSLQSEHSG LYYC QQYNDWPF TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 26)	QVTLLEESGPVLVKPTETLTLTCTVSG FSL SNARMGVS WIRQPPGKAPWFA HIFSTDE KSL RRLSRLTLSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD DSSNYEGYFDY WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 25)
11B11	EVLMTQSPATLSVSPGERATLS SCRASQS VSTNFAWY QQRPGQAPRLLLY GASTRAT GIPGRFSGSGSGTENILTISSLQSEDFA IYFC QQYKDWPF TFGPGSKVEIK (SEQ ID NO: 28)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSG FSL SNAKMGVS WIRQPPGKALEWLA HIFSTDE KSI RRSLRSRLTMSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCVR DSSNYEGYFDY WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 27)
21E7	DVVLTQSPATLSVSPGERATLS SCRASQS VNSNLAWY QQNPGQAPRLLI FGSSTRAT GIPASFGSGSGTEFTLTINSLQSEHSA VYYC QQYNDWPF TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 29)	QVTLLEESGPVLVKPTETLTLTCTVSG FSL SNARMGVS WIRQPPGKAPWFA HIFSTDE KSL RRLSRLTLSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD DSSNYEGYFDY WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 25)
12B2	EVVMTQSPATLSVSPGERATLS SCRASQS VINNLA WYQQKPGQAPRLLI YGTSTRAT DIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFA VYYC QDYNNWPF TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 31)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSG FSL SNPRMGVS WIRQPPGKALEWLG HIFSSDE KSY RLSRLSRLSI SKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCVR DSSNYGGYFDY WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 30)
11F10	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS SCRASQS VGSNLAWY QQKPGQAPRLLI YGASTRAS GVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFA VYSC QEYNNWPF TFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 33)	QVTLKESGPVLVKPIETLTLTCTVCG FSL SNPRMGVS WIRQPPGKALEWLG HIFSSDE KSY RFLRSRLSI SKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD DSSDYEGYFDY WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 32)
17G11	EVVMTQSPATLSVSPGERATLS SCRASQS VINNLA WYQQKPGQAPRLLI YGTSTRAT DIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFA VYYC QDYNNWPF TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 31)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTV FGFSL SNPRMGVS WIRQPPGKAPWLG HIFSSDE KSY RLSRLSRLSI SKDTSKSQVVFXTNM DPGDPATYYCVR DSSNYEYFDY WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 34)
29D5	KIVMTQSPATLSVSPGERATLS SCRANQI VSSNLAWY QQKPGQAPRLLV FGTSTRAT GIPIRFSGSGSGTEFTLTVSSLQSEDFA VYVC QQYNDWPF TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 36)	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSG FSL SNPRMGVS WLRQPPGKALEWFA HIFSTDE KSY SPSLRGRLTVSKDTSKSQVVLMTNM DPVDTATYYCARD DSSNYEGYFDY WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 35)
30D8	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSQS LLHNKRNNYLD WFLQKPGQSPQLLI YLA SNRAS GVPDRFSGSGSGIDFLKISRVE AEDVGVYYC MQAQQTPI TFGQGTREIK (SEQ ID NO: 38)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRSL SCEASGFTF SDAWMSWVR QAPGKLEW VGRIKSKTDGG TDY VVPLNGRFIISRDDSRNTLYLQNN LKTEDTAVYYCT VPGSYGY WGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 37)
20E12	DIVLTQSPLSLSPVTPGEPASIS CRSSQS LLYSNGKNYLD WFLHKGQSPQLLI YLG SNRAS GVPDRFSGSGSGIDFLKISRVE AEDVGVYYC MQAQQTPI TFGQGTREIK (SEQ ID NO: 40)	EVNLVESGGGLVKPGGSLRSL SCEASGFTF SYAWMSWVR QAPGKLEW VGRIKSIADGG ATDYA APVRNRFIISRDDSRNTLYLEMHS LKTEDTAVYYCT IPGNDAFDM WGQGTMV TVSS (SEQ ID NO: 39)
26B9	DIVLTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSSQS LLHRDGFNYLD WFLQKPGQSPQLLI YLA SSRAS GVPDRFSGSDSGTDFLKISRVE AEDVGVYYC MQALQTPIT FGQGTREIK (SEQ ID NO: 42)	EVQLVESWGVLVKPGGSLRSL SCEASGFIF NNAWMSWVR QAPGKLEW IGRIKSKSDGG TDYA APVKDRFTISRDDSKDTLYLQNMG LKTEDTAVYFCT APGGPFDY WGQGTLVTV VSS (SEQ ID NO: 41)

32G8	DIVLTQSP LS SVTPGEPASISCRSSQS <u>LLYSNGKNYLD</u> WFLHKPGQSPQLLIYLG <u>SNRAS</u> GVPDRFSGSGSGIDFILKISRVE AEDVGVYYC <u>MQAQQTPIT</u> FGQGRLEIK (SEQ ID NO: 40)	EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGFTF <u>SYAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSITDGG</u> <u>VIDYAAPVRNRCTISRDDSRNTLYLEMHS</u> LKTEDTAVYYCTT <u>IPGNDDFDM</u> WGQGRMV TVSS (SEQ ID NO: 43)
34E7	DIVLTQSP LS SVTPGEPASISCRSTQS <u>LLYSNGKNYLD</u> WFLHKPGQSPQLLIYLG <u>SIRAS</u> GVPDRFSGSGSGIDFILKISRVE AEDVGVYYC <u>MQAQQTPIT</u> FGQGRLEIK (SEQ ID NO: 45)	EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGFTF <u>SYAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSINDGG</u> <u>ATDYASPVRNRFTISRDDSRNMLYLEMHS</u> LKTEDTAVYYCTT <u>IPGNDAFDM</u> WGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 44)
20G5	DIVLTQSP LS LPVTPGEPASISCRSSQS <u>LLYSDRRNYLD</u> WFLQKPGQSPHLLIYLG <u>SYRAS</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC <u>MQALQIPIT</u> FGQGRLEIK (SEQ ID NO: 47)	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTF <u>TNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKIDGG</u> <u>TTDYAAPVKGRFIISRDDSKNTLSLQMNS</u> LKTEDTAMYCTT <u>APGGPFDY</u> WGQGSVLT VSS (SEQ ID NO: 46)
C6	ELQSVLTQPPASGTPGQRTVITSCSGSS <u>SNIGSNYVY</u> WYQQLPGTAPKILIIYRNNQ <u>RPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYC <u>AAWDDNLSGWV</u> FGTGKLTVL (SEQ ID NO: 49)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGDTF <u>SSNAISWVRQAPGQGLEWMGVIIPIFGTA</u> <u>DYAKQFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR</u> SEDTAVYYCAR <u>HITYHEYAGGYGGAMD</u> PW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 48)
B5	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQS <u>ISSYLN</u> WYQQKPKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC <u>QQSYSTPLT</u> FGQGRVLEIK (SEQ ID NO: 51)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>SNYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISGGGRT</u> <u>YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLR</u> AEDTAVYYCAR <u>AGLLYGGGVYPMDI</u> WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 50)

Также в настоящем изобретении обеспечиваются CDR части внеклеточных лиганд-связывающих доменов CAR к EGFRvIII (включая Chothia, Kabat CDR, и CDR контактные участки). Определение CDR областей находится в компетенции квалифицированного специалиста в данной области техники. Подразумевается, что в некоторых вариантах осуществления, CDR могут представлять собой комбинацию Kabat и Chothia CDR (также обозначаются как "комбинированные CR" или "расширенные CDR"). В некоторых вариантах осуществления, CDR представляют собой Kabat CDR. В других вариантах осуществления, CDR представляют собой Chothia CDR. Другими словами, в вариантах осуществления с более чем одной CDR, CDR могут быть любой из Kabat, Chothia, комбинацией CDR, или их комбинациями. Табл. 2 обеспечивает примеры CDR последовательностей, обеспечиваемых в настоящем изобретении.

Таблица 2

Тяжелая цепь			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
m62G7	TDYTLH (SEQ ID NO: 62) (Kabat); GYTFTD (SEQ ID NO: 63) (Chothia); GYTFTDYTLH (SEQ ID NO: 64) (УДЛИНЕННАЯ)	GIDPINGGTTYNQKFK G (SEQ ID NO: 65) (Kabat) GIDPINGGTTY (SEQ ID NO: 66) (Chothia)	GEAMDS (SEQ ID NO: 67)
h62G7	TDYTLH (SEQ ID NO: 62) (Kabat); GYTFTD (SEQ ID NO: 63) (Chothia); GYTFTDYTLH (SEQ ID NO: 64) (УДЛИНЕННАЯ)	GINPINGGTTYNQKFK G (SEQ ID NO: 68) (Kabat) GINPINGGTTY (SEQ ID NO: 69) (Chothia)	GEAMDS (SEQ ID NO: 67)
h62G7-H14	TDYTLH (SEQ ID NO: 62) (Kabat); GYTFTD (SEQ ID NO: 63) (Chothia); GYTFTDYTLH (SEQ ID NO: 64) (УДЛИНЕННАЯ)	GIWPITGGTTYNQKFK G (SEQ ID NO: 70) (Kabat) GIWPITGGTTY (SEQ ID NO: 71) (Chothia)	GAEAGS (SEQ ID NO: 72)
h62G7-EQ	TDYTLH (SEQ ID NO: 62) (Kabat); GYTFTD (SEQ ID NO: 63) (Chothia); GYTFTDYTLH (SEQ ID NO: 64) (УДЛИНЕННАЯ)	GIWPITGGTTYNQKFK G (SEQ ID NO: 70) (Kabat) GIWPITGGTTY (SEQ ID NO: 71) (Chothia)	GEAAGS (SEQ ID NO: 73)
42G9	SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSTDEKSLKLSLRS (SEQ ID NO: 77) (Kabat) HIFSTDEKSL (SEQ ID NO: 78) (Chothia)	DSSNYEGYFDF (SEQ ID NO: 79)
32A10	SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSTDEKSIRSLRS (SEQ ID NO: 83) (Kabat) HIFSTDEKSI (SEQ ID NO: 84) (Chothia)	DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85)
20B9	SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSTDEKSYSTSLRG (SEQ ID NO: 86) (Kabat) HIFSTDEKSY (SEQ ID NO: 87) (Chothia)	DSSNYEGYFDF (SEQ ID NO: 79)
14C11	NNARMGVS (SEQ ID NO: 88) (Kabat); GFSLNNAR (SEQ ID NO: 89) (Chothia); GFSLNNARMGVS (SEQ ID NO: 90) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSTDEKSFRTSLRS (SEQ ID NO: 91) (Kabat) HIFSTDEKSF (SEQ ID NO: 92) (Chothia)	DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85)
21E11	SNVRMGVS (SEQ ID NO: 93) (Kabat); GFSLSNVR (SEQ ID NO: 94) (Chothia); GFSLSNVRMGVS (SEQ ID NO: 95) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSSDEKSIRSLRS (SEQ ID NO: 96) (Kabat) HIFSSDEKSI (SEQ ID NO: 97) (Chothia)	DSSNYEGYFDF (SEQ ID NO: 79)

	NO: 95) (УДЛИНЕННАЯ)	(Chothia)	
49B11	SNVRMGVS (SEQ ID NO: 93) (Kabat); GFSLSNVR (SEQ ID NO: 94) (Chothia); GFSLSNVRMGVS (SEQ ID NO: 95) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSSDEKSIRRLRS (SEQ ID NO: 96) (Kabat) HIFSSDEKSI (SEQ ID NO: 97) (Chothia)	DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85)
46E10 12H6	SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSTDEKSIRRLRS (SEQ ID NO: 83) (Kabat) HIFSTDEKSI (SEQ ID NO: 84) (Chothia)	DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85)
19A9 21E7	SNARMGVS (SEQ ID NO: 80) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 81) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 82) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSTDEKSLRLRS (SEQ ID NO: 98) (Kabat) HIFSTDEKSL (SEQ ID NO: 78) (Chothia)	DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85)
11B11	SNARMGVS (SEQ ID NO: 99) (Kabat); GFSLSNAR (SEQ ID NO: 100) (Chothia); GFSLSNARMGVS (SEQ ID NO: 101) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSTDEKSIRRLRS (SEQ ID NO: 83) (Kabat) HIFSTDEKSI (SEQ ID NO: 84) (Chothia)	DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85)
12B2	SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSSDEKSYRLRS (SEQ ID NO: 102) (Kabat) HIFSSDEKSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia)	DSSNYGGYFDY (SEQ ID NO: 104)
11F10	SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSSDEKSYRLFLRS (SEQ ID NO: 105) (Kabat) HIFSSDEKSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia)	DSSDYEGYFDY (SEQ ID NO: 107)
17G11	SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSSDEKSYRLRS (SEQ ID NO: 102) (Kabat) HIFSSDEKSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia)	DSSNYEEYFDY (SEQ ID NO: 108)
29D5	SNPRMGVS (SEQ ID NO: 74) (Kabat); GFSLSNPR (SEQ ID NO: 75) (Chothia); GFSLSNPRMGVS (SEQ ID NO: 76) (УДЛИНЕННАЯ)	HIFSTDEKSYSPSLRG (SEQ ID NO: 106) (Kabat) HIFSTDEKSY (SEQ ID NO: 87) (Chothia)	DSSNYEGYFDY (SEQ ID NO: 85)
30D8	SDAWMS (SEQ ID NO: 109) (Kabat); GFTFSD (SEQ ID NO: 110) (Chothia); GFTFSDAWMS (SEQ ID NO: 111) (УДЛИНЕННАЯ)	RIKSKTDGGTTDYVVP LNG (SEQ ID NO: 112) (Kabat) RIKSKTDGGTTDY (SEQ ID NO: 113) (Chothia)	VPGSYGY (SEQ ID NO: 114)
20E12	SYAWMS (SEQ ID NO: 115) (Kabat); GFTFSY (SEQ ID NO: 116) (Chothia); GFTFSYAWMS (SEQ ID NO: 119)	RIKSIADGGATDYAAP VRN (SEQ ID NO: 118) (Kabat) RIKSIADGGATDY (SEQ ID NO: 119)	IPGNDAFDM (SEQ ID NO: 120)

	NO: 117) (УДЛИНЕННАЯ)	(Chothia)	
26B9	NNAWMS (SEQ ID NO: 121) (Kabat); GFIFNN (SEQ ID NO: 122) (Chothia); GFIFNNAWMS (SEQ ID NO: 123) (УДЛИНЕННАЯ)	RIKSKSDGGTTDYAAP VKD (SEQ ID NO: 124) (Kabat) RIKSKSDGGTTDY (SEQ ID NO: 125) (Chothia)	APGGPFY (SEQ ID NO: 126)
32G8	SYAWMS (SEQ ID NO: 115) (Kabat); GFTFSY (SEQ ID NO: 116) (Chothia); GFTFSYAWMS (SEQ ID NO: 117) (УДЛИНЕННАЯ)	RIKSITDGGVIDYAAP VRN (SEQ ID NO: 127) (Kabat) RIKSITDGGVIDY (SEQ ID NO: 128) (Chothia)	IPGNDDFDM (SEQ ID NO: 129)
34E7	SYAWMS (SEQ ID NO: 115) (Kabat); GFTFSY (SEQ ID NO: 116) (Chothia); GFTFSYAWMS (SEQ ID NO: 117) (УДЛИНЕННАЯ)	RIKSINDGGATDYASP VRN (SEQ ID NO: 130) (Kabat) RIKSINDGGATDY (SEQ ID NO: 131) (Chothia)	IPGNDAFDM (SEQ ID NO: 120)
20G5	TNAWMS (SEQ ID NO: 132) (Kabat); GFTFTN (SEQ ID NO: 133) (Chothia); GFTFTNAWMS (SEQ ID NO: 134) (УДЛИНЕННАЯ)	RIKSKIDGGTTDYAAP VKG (SEQ ID NO: 135) (Kabat) RIKSKIDGGTTDY (SEQ ID NO: 136) (Chothia)	APGGPFY (SEQ ID NO: 126)
C6	SSNAIS (SEQ ID NO: 137) (Kabat); GDTFSS (SEQ ID NO: 138) (Chothia); GDTFSSNAIS (SEQ ID NO: 139) (УДЛИНЕННАЯ)	VIIPIFGTADYAQKFQ G (SEQ ID NO: 140) (Kabat) VIIPIFGTADY (SEQ ID NO: 141) (Chothia)	HTYHEYAGGYGG AMDP (SEQ ID NO: 142)
B5	SNYAMS (SEQ ID NO: 143) (Kabat); GFTFSN (SEQ ID NO: 144) (Chothia); GFTFSNYAMS (SEQ ID NO: 145) (УДЛИНЕННАЯ)	DISGGGGRTYYADSVK G (SEQ ID NO: 146) (Kabat) DISGGGGRTYY (SEQ ID NO: 147) (Chothia)	AGLLYGGGVYPM DI (SEQ ID NO: 148)
Легкая цепь			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
m62G7 h62G7	KSSQSLLYSNGKTYLN (SEQ ID NO: 149)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 150)	VQDTHFPLT (SEQ ID NO: 151)
h62G7-L6	KSSQSLLYSNGKTYLN (SEQ ID NO: 149)	QVSKLDS (SEQ ID NO: 152)	GQDTHFPLT (SEQ ID NO: 153)
h62G7-L1-DV	KSSQSLLYSNDKTYTN (SEQ ID NO: 154)	EVSKLDV (SEQ ID NO: 155)	GQDTHFPLT (SEQ ID NO: 153)
42G9	RASQSVRSNLA (SEQ ID NO: 156)	GSTIRAT (SEQ ID NO: 157)	QQYSDWPFT (SEQ ID NO: 158)
32A10	RASQSVSSNFA (SEQ ID NO: 159)	GATTRAT (SEQ ID NO: 160)	QQYKDWPF (SEQ ID NO: 161)
20B9	RVSQSIGANLA (SEQ ID NO: 162)	GATRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYIYWPFT (SEQ ID NO: 164)
14C11	RASQSVSNLA (SEQ ID NO: 165)	GATRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYKDWPF (SEQ ID NO: 161)

21E11	RASQSVGSDLA (SEQ ID NO: 166)	GASTRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167)
49B11	RASQNIQSDLA (SEQ ID NO: 168)	GASTRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167)
46E10	RASQSVTSNFA (SEQ ID NO: 169)	GASTRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYKDWPFPT (SEQ ID NO: 161)
12H6	RASQGVSSNFA (SEQ ID NO: 170)	GASTRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYKDWPFPT (SEQ ID NO: 161)
19A9	RASQSVNRNLA (SEQ ID NO: 171)	GTSTRAT (SEQ ID NO: 172)	QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167)
11B11	RASQSVSTNFA (SEQ ID NO: 173)	GASTRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYKDWPFPT (SEQ ID NO: 161)
21E7	RASQSVNSNLA (SEQ ID NO: 174)	GSSTRAT (SEQ ID NO: 175)	QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167)
12B2 17G11	RASQSVINNLA (SEQ ID NO: 176)	GTSTRAT (SEQ ID NO: 172)	QDYNNWPFT (SEQ ID NO: 177)
11F10	RASQSVGSNLA (SEQ ID NO: 178)	GASTRASG (SEQ ID NO: 179)	QEYNNWPFT (SEQ ID NO: 180)
29D5	RANQIVSSNLA (SEQ ID NO: 181)	GTSTRAT (SEQ ID NO: 172)	QQYNDWPFT (SEQ ID NO: 167)
30D8	RSSQSLLNKRNNYLD (SEQ ID NO: 182)	LASNRRAS (SEQ ID NO: 183)	MQAQQTPIT (SEQ ID NO: 184)
20E12 32G8	RSSQSLLYSNGKNYLD (SEQ ID NO: 185)	LGSNRRAS (SEQ ID NO: 186)	MQAQQTPIT (SEQ ID NO: 184)
26B9	RSSQSLLRDGFNYLD (SEQ ID NO: 187)	LASSRRAS (SEQ ID NO: 188)	MQALQTPIT (SEQ ID NO: 189)
34E7	RSTQSLLYSNGKNYLD (SEQ ID NO: 190)	LGSIRAS (SEQ ID NO: 191)	MQAQQTPIT (SEQ ID NO: 184)
20G5	RSSQSLLYSDRRNYLD (SEQ ID NO: 192)	LGSYRRAS (SEQ ID NO: 193)	MQALQIPIT (SEQ ID NO: 194)
C6	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 195)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 196)	AAWDDNLSGVV (SEQ ID NO: 197)
B5	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 198)	AASSLQS (SEQ ID NO: 199)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 200)

Изобретение охватывает модификации CAR и полипептидов согласно вариантам изобретения, представленным в табл. 1, включая функциональные эквиваленты CAR, имеющие модификации, которые не оказывают существенного влияния на их свойства, и варианты, которые усиливают или снижают активность и/или аффинность. Например, аминокислотная последовательность может быть мутирована для получения антитела с желательной аффинностью связывания с EGFRvIII. Модификации полипептидов являются обычной практикой в данной области техники и нет необходимости описывать их более подробно в настоящем изобретении. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, одной или несколькими делециями или добавлениями аминокислот, которые не оказывают существенного неблагоприятного изменения функциональной активности, или которые созревают (усиливают) аффинность полипептида к его лиганду, или используют химические аналоги.

Инсерции аминокислотных последовательностей включают амино- и/или карбоксил-концевые слияния, протяженностью в длину от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни или больше остатков, а также инсерции внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают антитело с N-концевым метионильным остатком или антитело, слитое с эпитопной меткой. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела фермента или полипептида, которое повышает период полувыведения антитела в кровообращении.

Варианты замещения имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела удаленный и на его место вставленный отличающийся остаток. Сайты, представляющие наибольший интерес для замещающего метагенеза, включают гипервариабельные области, но охватываются также изменениями FR. Консервативные замены представлены в табл. 3 под заголовком "консервативные замены." Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то в дальнейшем могут быть

интродуцированы более существенные изменения, обозначенные как "типичные замены" в табл. 3, или как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, и продукты подвергаться скринингу. В некоторых вариантах осуществления, варианты замен антител, обеспечиваемые в настоящем изобретении, имеют не более, чем 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, или 1 консервативную замену в VH или VL области по сравнению со сравниваемым исходным антителом. В некоторых вариантах осуществления, замены не осуществляются в пределах CDR из VH или VL области.

Таблица 3

Аминокислотные замены

Исходный остаток (встречающаяся в природе аминокислота)	Консервативные замены	Типичные замены
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Ile	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

В некоторых вариантах осуществления, изобретение обеспечивает CAR, содержащий внеклеточный лиганд-связывающий домен, который связывается с EGFRvIII и конкурирует за связывание с EGFRvIII с антителами, описанными в настоящем изобретении, или CAR, описанными в настоящем изобретении (например, табл. 5A), включая m62G7, h62G7, h62G7-H14/LI-DV, h62G7-L6/EQ, 42G9, 32A10, 20B9, 14C11, 21E11, 49B11, 46E10, 12H6, 19A9, 21E7, 11B11, 12B2, 11F10, 17G11, 29D5, 30D8, 20E12, 26B9, 32G8, 34E7, 20G5, C6, и B5.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение обеспечивает CAR, содержащие CDR части антител к EGFRvIII антителам на основании CDR контактных участков. CDR контактные участки представляют собой участки антитела, которые придают специфичность антителу к антигену. В целом, CDR контактные участки включают части остатков в CDR и верньерные зоны, которые устанавливают пределы для поддержания правильной петлевой структуры для антитела для связывания специфического антигена. См., например, Makabe и др., J. Biol. Chem., 283:1156-1166, 2007. Определение контактных участков CDR хорошо известно квалифицированному специалисту в данной области техники.

Аффинность связывания (K_D) EGFRvIII специфических CAR, как описано в настоящем изобретении с EGFRvIII (такими как humEGFRvIII (например, (SEQ ID NO: 201)) может составлять приблизительно 0,001 - приблизительно 5000 нМ. В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания составляет приблизительно любое из 5000 нМ, 4500 нМ, 4000 нМ, 3500 нМ, 3000 нМ, 2500 нМ, 2000 нМ, 1789 нМ, 1583 нМ, 1540 нМ, 1500 нМ, 1490 нМ, 1064 нМ, 1000 нМ, 933 нМ, 894 нМ, 750 нМ, 705 нМ, 678 нМ, 532 нМ, 500 нМ, 494 нМ, 400 нМ, 349 нМ, 340 нМ, 353 нМ, 300 нМ, 250 нМ, 244 нМ, 231 нМ, 225 нМ, 207 нМ, 200 нМ, 186 нМ, 172 нМ, 136 нМ, 113 нМ, 104 нМ, 101 нМ, 100 нМ, 90 нМ, 83 нМ, 79 нМ, 74 нМ, 54 нМ, 50 нМ, 45 нМ, 42 нМ, 40 нМ, 35 нМ, 32 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 24 нМ, 22 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 18 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 12 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7,5 нМ, 7 нМ, 6,5 нМ, 6 нМ, 5,5 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,3 нМ, 0,1 нМ, 0,01 нМ, или 0,001 нМ. В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания составляет менее, чем приблизительно любое из 5000 нМ, 4000 нМ, 3000 нМ, 2000 нМ, 1000 нМ, 900 нМ, 800 нМ, 250 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 7,5 нМ, 7 нМ, 6,5 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4,5 нМ, 4 нМ, 3,5 нМ, 3 нМ, 2,5 нМ, 2 нМ, 1,5 нМ, 1 нМ, или 0,5 нМ.

Внутриклеточный сигнальный домен CAR в соответствии с изобретением отвечает за внутриклеточную передачу сигналов с последующим связыванием внеклеточный лиганд-связывающего домена с мишенью, что приводит к активации иммунной клетки и иммунной ответной реакции. Внутриклеточный сигнальный домен имеет способность активировать по меньшей мере одну из нормальных эффекторных

функций иммунной клетки, в которой экспрессируется CAR. Например, эффекторной функция Т клетки может быть цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен для применения в CAR может представлять собой цитоплазматические последовательности, например, без ограничения, Т-клеточный рецептор и со-рецепторы, которые действуют совместно для инициации передачи сигналов после захвата рецептором антигена, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любую синтетическую последовательность, которая имеет идентичную функциональную способность. Внутриклеточные сигнальные домены включают два различных класса цитоплазматических сигнальных последовательностей: те, которые иницируют антиген-зависимую первичную активацию, и те, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или ко-стимулирующий сигнал. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности могут содержать сигнальные мотивы, которые известны в качестве иммунорецепторных активационных мотивов на основании тирозина ITAM. ITAM представляют собой хорошо определенные сигнальные мотивы, обнаруженные во внутриклеточном хвосте различных рецепторов, которые служат в качестве сайтов связывания для тирозин-киназ класса syk/zap70. Примеры ITAM, используемые в изобретении, могут включать, в качестве неограничивающих примеров, те, которые имеют происхождение из TCR ζ , FcR γ , FcR β , FcR ϵ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать CD3 ζ (зета) сигнальный домен, который имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере приблизительно 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, 95%, 97%, или 99% последовательностью, идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 205. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR согласно изобретению содержит домен костимулирующей молекулы.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен CAR согласно изобретению содержит часть костимулирующей молекулы, выбранную из группы, включающей фрагмент 41BB (GenBank: AAA53133.) и CD28 (NP_006130.1). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен CAR согласно изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая содержит по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, 95%, 97%, или 99% последовательности, идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ. ID NO: 213 (CD28 сигнальный домен) или SEQ ID NO: 204 (4-1BB сигнальный домен).

CAR экспрессируются на поверхностной мембране клетки. Таким образом, CAR может содержать трансмембранный домен. Подходящие трансмембранные домены для CAR, раскрытых в настоящем изобретении, имеют способность (а) экспрессироваться на поверхности клетки, предпочтительно иммунной клетки, такой как, например, но не ограничиваясь только ими, лимфоцитные клетки или природные клетки-киллеры (NK), и (б) взаимодействовать с лиганд-связывающим доменом и внутриклеточным сигнальным доменом для направления клеточного ответа иммунной клетки на заранее определенную клетку-мишень. Трансмембранный домен может иметь происхождение либо с природного или синтетического источника. Трансмембранный домен может иметь происхождение из любого мембранно-связанного или трансмембранного белка. В качестве неограничивающих примеров, трансмембранный полипептид может представлять собой субъединицу Т-клеточного рецептора, такую как α , β , γ или δ , полипептид, составляющий CD3 комплекс, IL-2 рецептор p55 (α цепь), p75 (β цепь) или γ цепь, субъединичную цепь Fc рецепторов, в особенности Fc γ рецептор III или CD белки. Альтернативно, трансмембранный домен может быть синтетическим и может содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых вариантах осуществления, указанный трансмембранный домен имеет происхождение из цепи CD8 α человека (например, NP_001139345.1). CAR дополнительно может содержать стволочный домен между внеклеточным лиганд-связывающим доменом и указанным трансмембранным доменом. Стволочный домен может содержать вплоть до 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот и наиболее предпочтительно 25-50 аминокислот. Стволочный участок может иметь происхождение из всей или части встречающихся в природе молекул, такой как, из всей или части внеклеточной области CD8, CD4, или CD28, или из всех или части константной области антитела. Альтернативно, стволочный домен может представлять собой синтетическую последовательность, которая соответствует встречающейся в природе стволочной последовательности или может представлять собой полностью синтетическую стволочную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, указанный стволочный домен является частью CD8 α цепи человека (например, NP_001139345.1). В другом предпочтительном варианте осуществления, указанный трансмембранный и петлевой домены содержат часть CD8 α цепи человека, предпочтительно которые содержат по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, 95%, 97%, или 99% последовательности, идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 210 и SEQ ID NO: 208, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, CAR, раскрытые в настоящем изобретении, могут содержать внеклеточный лиганд-связывающий домен, который специфически связывает EGFRvIII,

CD8 α петлю человека и трансмембранные домены, CD3 ζ сигнальный домен, и 4-1BB сигнальный домен.

В табл. 4 представлены типичные последовательности доменов, которые можно использовать в CAR, раскрытых в настоящем изобретении.

Таблица 4

Типичные последовательности CAR компонентов

Домен	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
CD8 α сигнальный пептид	MALPVTALLLPLALLLHAARP	206
Fc γ RIII α петля	GLAVSTISSFFPPGYQ	207
CD8 α петля	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	208
IgG1 петля	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	209
CD8 α трансмембранный (TM) домен	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYC	210
41BB внутриклеточный сигнальный домен (ISD)	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	203
CD3 ζ внутриклеточный сигнальный домен (ISD)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	205
Fc ϵ RI α -TM-IC (Fc ϵ RI α цепь трансмембранный и внутриклеточный домен)	FFIPLLVI LFAVDTGLFISTQQQVTFLLKIKRTRKGFRLNPHPKPNKNN	211
Fc ϵ RI β - Δ ITAM (Fc ϵ RI β цепь без ITAM)	MDTESNRRANLALPQEPSSVPAFEVLEISPQEVSSGRLLKSASSPPLHTWLTVLKKEQEFGLVGTQILTAMI CLCFGTVVCSVLDI SHIEGDI FSSFKAGYPFWGAI FFSISGMLSII SERNATYLVRGSLGANTASSIAGGTGITILLI INLKKSLAYIHIHSCQKFFETKCFMASFSTEIVVMMLFLTITLGLGSVSLTICGAGEELKGNKVPE	212
41BB-IC (41BB со-сигнальный домен)	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	204
CD28-IC (CD28 со-сигнальный домен)	RSKRSRGGHSDYMNMPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	213
Fc ϵ RI γ -SP (сигнальный пептид)	MIPAVVLLLLLVEQAAA	214
Fc ϵ RI γ - Δ ITAM (Fc ϵ RI γ цепь без ITAM)	LGEPQLCYILDALFLYGIIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEKS	215
GSG-P2A (GSG-P2A полипептид рибосомального прыжка)	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	216
GSG-T2A (GSG-T2A полипептид рибосомального прыжка)	GSGEGRGSLTICGDVEENPGP	217

В табл. 5A представлены аминокислотные последовательности типичных EGFRvIII специфических CAR согласно настоящему изобретению. В табл. 5A, последовательность сигнального/лидерного пептида выделена жирным шрифтом, и GS линкер ((GGGS) $_4$ (SEQ ID NO: 202)) подчеркнут.

Аминокислотные последовательности типичных EGFRvIII специфических CAR

CAR	Аминокислотная последовательность CAR	Компоненты (в порядке, с N-конца до C-конца)
h62G7-L6/EQ	MALPVTALLPLALLHAARP DVVMTQSPLSLFPVTLGQPASISCKSSQ SLLYSNGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYQVSKLDSGVDRFSGSGSGTD FTLKI SRVEAEDVGVYYCGQDTHFPLTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSG GGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYLTHHWVRQ APGQGLEWMGGIWPITGGTTYNQKFKGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLR SEDTAVYYCARGEAQGSWGGQGLVTVSSTTPAPRPPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR (SEQ ID NO: 52)	CD8α сигнальный пептид; h62G7-L6/EQ VL (Таблица 1 SEQ ID NO: 6); GS линкер [(GGGGS) ₄ (SEQ ID NO: 202)]; h62G7-L6/EQ VH (Таблица 1 SEQ ID NO: 5); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
42G9	MALPVTALLPLALLHAARP QVTLKESGPVLLKPTETLTLTCTVSGF SLSNPRMGVSWIRQPPGKALEWFAHIFSTDEKSLKLSLRSRLTSLKDT SKSQVVLMTNMAPVDSATYYCARDSSNYEGYDFDWGGQGLVTVSSGG GGSGGGGGGGGGGGSEVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVR SNLAWYQQKSGQAPRLLIYGSTIRATGVPARFSGSGSGTEFTLTISSL QSEDFAIYFCQQYKDWPFYFGPGSKVDIKTTTPAPRPPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 53)	CD8α сигнальный пептид; 42G9 VH (Таблица 1 SEQ ID NO: 9); GS линкер; 42G9 VL (Таблица 1 SEQ ID NO: 10); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
32A10	MALPVTALLPLALLHAARP QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGF SLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSTDEKSI RRSLSRSLTSLKDT SKSQVVLMTNMDPVDTATYFCARDSSNYEGYFDYWGQGLVTVSSGG GGSGGGGGGGGGGGSEVVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSVS SNFAWYQQRPGQAPRLLLYGATTRATGLPGRFSGSGSGTENILTISSL QSEDFAIYFCQQYKDWPFYFGPGSKVDIKTTTPAPRPPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 54)	CD8α сигнальный пептид; 32A10 VH (Таблица 1 SEQ ID NO: 11); GS линкер; 32A10 VL (Таблица 1 SEQ ID NO: 12); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
20B9	MALPVTALLPLALLHAARP QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGF SLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLGHI FSTDEKSYSTSLRGRI TISKDT SRGLVVLTLNMDPVDTATYFCARDSSNYEGYDFDWGPGFLVTVSSGG GGSGGGGGGGGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRVSQSIG ANLAWYQQKFGQAPRLLIYGASTRATGIPVRFSGGSGTEFTLTISSL	CD8α сигнальный пептид; 20B9 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 13); GS линкер;

	QSEDFAIYSCQYIYWPFTFGPGTTVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK SRADAPAYQQGQNLQYLNELNLGRREEYDVLKRRGRDPFEMGGKPRR NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 55)	20B9 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 14); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
14C11	MALPVTALLPLALLHAARP QVTLKESGPVLVKPTE TLTLCTVSGF SLNNARMGVSWIRQPPGKALEWFAHIFSTDEKSFRTSLRSRLTSLKDT SKSQVVLMTNMDPVDATATYYCARDSSNYEGYFDYWGQILVTVSSGG GGSGGGGGGGGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVS NNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGVPARFSGSDSGTEFSLTISSL QSEDFAVYFCQYKDWPFPTFGPGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK SRADAPAYQQGQNLQYLNELNLGRREEYDVLKRRGRDPFEMGGKPRR NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 56)	CD8α сигнальный пептид; 14C11 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 15); GS линкер; 14C11 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 16); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
20E12	MALPVTALLPLALLHAARP EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGF TFSYAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSIADGGATDYAAPVRNRFTI SRD DSRNTLYLEMHSLKTEDTAVYYCTTIPGNDAFDMWQGTMTVTVSSGGG GGGGGGGGGGGGGGSDIVLTQSPSLSLVTPGEPASISCRSSQSLLY SNGKNYLDWFLHKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDFILK ISRVEAEDVGVYYCMQAQQTPI TFGQGRLEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRADAPAYQQGQNLQYLNELNLGRREEYD VLKRRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 57)	CD8α сигнальный пептид; 20E12 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 39); GS линкер; 20E12 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 40); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
32G8	MALPVTALLPLALLHAARP EVNLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGF TFSYAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSI TDGGVIDYAAPVRNRCTI SRD DSRNTLYLEMHSLKTEDTAVYYCTTIPGNDDFDMWQGRMVTVSSGGG GGGGGGGGGGGGGGSDIVLTQSPSLSLVTPGEPASISCRSSQSLLY SNGKNYLDWFLHKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDFILK ISRVEAEDVGVYYCMQAQQTPI TFGQGRLEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRADAPAYQQGQNLQYLNELNLGRREEYD VLKRRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 58)	CD8α сигнальный пептид; 32G8 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 43); GS линкер; 32G8 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 40); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
26B9	MALPVTALLPLALLHAARP EVQLVESWGLVVKPGGSLRLSCEASGF IFNNAWMSWVRQAPGKGLEWIGRIKSKSDGGTTDYAAPVKDRFTI SRD DSKDTLYLQMNGLKTEDTAVYFCTTAPGGPFYWGQGLTVTVSSGGGG GGGGGGGGGGGGGGSDIVLTQSPSLSLVTPGEPASISCRSSQSLHR DGFNYLDWFLQKPGQSPQLLIYLAASRASGVPDRFSGSDSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPI TFGQGRLEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRADAPAYQQGQNLQYLNELNLGRREEYD VLKRRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 59)	CD8α сигнальный пептид; 26B9 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 41); GS линкер; 26B9 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 42); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
30D8	MALPVTALLPLALLHAARP EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGF TFSDAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYVPLNGRFI SRD DSRNTLYLQNNLKTEDTAVYYCTTVPGSYGWQGLTVTVSSGGGG GGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPSLSLVTPGEPASISCRSSQSLHNR RNNYLDWFLQKPGQSPQLLIYLAASRASGVPDRFSGSGSDFTLKIS	CD8α сигнальный пептид; 30D8 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 37); GS линкер;

	RVEAEDVGVYVYCMQAQQTPITFGQGRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNLQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATK DTYDALHMQLPPR (SEQ ID NO: 60)	30D8 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 38); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
C6	MALPVTALLPLALLHAARP QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGD TFSSNAISWVRQAPGQGLEWMGVIIPIFGTADYAQKFGQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVVYCARHITYHEIYAGGYGGAMDFWQGTLVLT VSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGSELQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCS GSSSNIGSNYVYVYQQLPGTAPKILLYRNNQRFSGVDRFSGSKSGTS ASLAI SGLRSEDEADYYCAAWDDNL SGWVFGTGTGKLVLTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVI TLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLQLYNELNLGRREYDVLDRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLY QGLSTATKDTYDALHMQLPPR (SEQ ID NO: 61)	CD8α сигнальный пептид; C6 VII (Таблица 1, SEQ ID NO: 48); GS линкер; C6 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 49); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен

В табл. 5B представлены нуклеотидные последовательности типичных scFvs для EGFRvIII специфических CAR согласно настоящему изобретению. В табл. 5B, последовательность, кодирующая CD8α сигнальный/лидерный пептид, подчеркнута.

Таблица 5B

Нуклеотидные последовательности типичных EGFRvIII специфических scFvs

CAR	scFv Нуклеотидная последовательность
h62G7-L6/EQ scFv	<u>ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCTCGCCCTGATG</u> TGGTCACTGACTCAGTCTCCCTGTCTCTGCCCGTCACCGTGGGACAGCCCGCCAGCATCTCTGCAA GAGTCCCAGAGCCTGCTGTACTCCACGGCAAGACCTATCTGAATTGGTTCCAGCAGAGACCCGGC CAGAGCCCTCGGAGACTGATCTACCGAGGTGTCTAAGCTGGACAGCGGCCTGCCTGATCGCTTCTCTG GAAGCGGATCCGGAAACCGACTTTACACTGAAGATCAGCCGGGTGGAGGCAGAGGACGTTGGCGGTGTA CTATTGGCGCCAGGATACCCACTTCCCACTGACATTTGGCGGGCCACCAAGGTGGAGATCAAGGGA GGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGGCGGGCGGCTCTGGCGGGCGGGCAGCCAGGTGCAGC TGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCTTGTAAAGGCCAGCGG CTACACATTCACCGATTATACACTGCACTGGGTGCGGAGGCCCCCTGGCCAGGGACTGGAGTGGATG GGAGGAATCTGGCCTATCACCGGAGGAACACATACAACCAGAAGTTTAAAGGCGAGGTGACAATGA CCAGGGACACATCTACCAGCACAGTGTATATGGAGCTGTCTAGCCTGCGCTCCGAGGATACAGCCGT GTAATATTGGCCAGAGGCGAGGCACAGGGATCTTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTCTCT
42G9 scFv	<u>ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCAAGGCCTCAGG</u> TGACCCCTGAAGGAGAGCGGGCCCTGTGCTGCTGAAGCCAAACAGAGACCCCTGACACTGACCTGCACAGT GTCTGGCTTCAGCCTGTCCAAACCCCGGATGGGCGTGAGCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGCC CTGGAGTGGTTCGCCCACATCTTTTCTACCGATGAGAAGAGCCTGAAGCTGTCCCTGAGATCTAGGC TGACCCCTGAGCAAGGACACATCTAAGAGCCAGGTGGTGTGACCATGACAACATGGCCCTGTGGA CTCCGCCACATACTATTGCGCCAGAGACAGCTCCAATTACGAGGGCTATTTGACTTTTGGGGCCAG GGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGGCGGGCT CCGGCGGGCGGGCTCCGAGGTGGTGTGACCCAGAGCCCTGCCACACTGTCCGTGTCTCCAGGCGA GAGAGCCACCCCTGTCTTGTAGGGCCAGCCAGTCCGTGCCAGCAATCTGGCCCTGGTACCAGCAGAAG TCCGGCCAGGCCCAAGACTGCTGATCTATGGCTCCACCATCAGGGCCACAGGAGTCCAGCACGCT TCTCTGGAAGCGGATCCGGCACAGAGTTTACCTGACAACTCTCTCTCTGCACTCCGAGGATTTCCG CGTGTACTATTGCCAGCAGTACTGACTGGCCCTTACCTTTGGCCCTGGCACAAAGGTGGATATC AAG (SEQ ID NO: 229)
32A10 scFv	<u>ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCAAGGCCACAGG</u> TGACCCCTGAAGGAGTCCGGCCCCGTGCTGGTGAAGCCTACAGAGACCCCTGACACTGACCTGCACAGT GTCCGGCTTCTCTCTGAGCAACGCCCGCATGGGCGTGTCTTGGATCAGGCAGCCCTGGCAAGGCC

	CTGGAGTGGCTGGCCACATCTTTTCCACCGACGAGAAGTCTATCCGGAGAAGCCTGCGCTCCAGGC TGACCCCTGAGCAAGGATACATCCAAGTCTCAGGTGGTGTGACCATGACAAACATGGACCCCGTGGA TACCGCCACATACTTCTGGCCAGAGACAGCTCCAATTACGAGGGCTATTTTGATTACTGGGGCCAG GGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGGCGGGCT CTGGCGGGCGGGCAGCGAGGTGGTGTGACCCAGAGCCAGCCACACTGAGCGTGTCCCTGGCGA GAGGGTGACCCGTCTGTAGGGCATCTCAGAGCGTGTCTTAACTTCGCTGGTATCAGGCGAGGA CCAGGCCAGGCACCAAGGCTGTGTGTACGGAGCAACCACAAGAGCCACAGGACTGCCCCGGCAGGT TTTCCGGATCTGGAAGCGGCACCGAGAATATCTGACAACTCAGCTCCCTGCAGTCTGAGGACTTCGC CATCTATTTTGGCAGCAGTACAAGGATTGGCCATTACCTTTGGCCCCGGCAGCAAGGTGGACATC AAG (SEQ ID NO: 230)
20B9 scFv	ATGGCTCTGCCCCGCACCGCTCTGTGTGCTGCCACTGGCCCTGTGTGTGCACGCAGCAAGACCTCAGG TGACCCCTGAAGGAGTCCGGCCCTGTGTGGTGAAGCCACAGAGACCCCTGACACTGACCTGCACAGT GTCTGGCTTCAGCCTGTCCAACGCAAGGATGGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGCC CTGGAGTGGCTGGGCCACATCTTTAGCACCGACGAGAAGTCTTACAGCACATCCCTGAGAGGAGGA TCACCATCTCTAAGGATACAAGCAGAGGCCCTGGTGGTGTGACCCCTGACAAACATGGACCCCGTGG A TACCGCCACATACTATTGGCCAGGACAGCTCCAATTACGAGGGCTATTTTCGATTTTGGGGCCCT GGCTTCCCTGGTGACCGTGTCTAGCGCGGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCGGGCGGGCGGGCTCTGAGATCGTGATGACCCAGTCCCTGCCACACTGTCTGTGAGCCAGGCCA GAGAGCCACCCTGTCTGTAGGGTGTCCCAGTCTATCGGCGCCAATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAG TTCGGCCAGGCCCAAGGCTGTGTATCTATGGAGCATCCACCAGAGCCACAGGAATCCCCGTGAGGT TCTCCGGAGGAGGATCTGGAACCGAGTTTACCCTGACAACTCCCTCTCTGCAGAGCGGAGACTTTGC CATCTACTCTGCCAGCAGTACATCTATTGGCCCTTACATTTGGCCCTGGCACACAGTGGATATC AAG (SEQ ID NO: 231)
14C11 scFv	ATGGCTCTGCCCCGCACCGCTCTGTGTGCTGCCACTGGCCCTGTGTGTGCACGCAGCAAGACCA CAGG TGACCCCTGAAGGAGAGCGGACCCGTGTGGTGAAGCCACAGAGACCCCTGACACTGACCTGCACAGT GAGCGGCTTCTCCCTGAACAATGCAAGGATGGGCGTGTCTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGCC CTGGAGTGGTTCGGCCACATCTTTAGCACCGACGAGAAGTCTTTTCGCACATCTCTGAGAAGCAGGC TGACCCCTGAGCAAGGATACAAGCAAGTCCCAGGTGGTGTGACCATGACAAACATGGACCCCGTGG A TACCGCCACATACTATTGGCCAGAGACAGCTCCAATTACGAGGGCTATTTTCGATTACTGGGGCCAG GGCATCTGGTGACCGTGTCTAGCGCGGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCGGGCGGGCGGGCTCTGAGATCGTGATGACCCAGTCTCCCGCCACACTGTCTGTGAGCCCTGGCA GAGAGCCACACTGAGCTGTAGGGCCCTCCAGTCTGTGAGCAACAATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCAGGCCAGGCACCAAGGCTGTGTATCTACGGAGCATCCACCAGAGCCACAGGAGTCCAGCAAGGT TCTCCGGATCTGACAGCGGCACCGAGTTTAGCCTGACAACTCCCTCTCTGCAGTCCGAGGACTTCGC CGTGTATTTTGGCAGCAGTACAAGGATTGGCCATTACCTTTGGCCCCGGCACAAGGTGGAGATC AAG (SEQ ID NO: 232)
20E12 scFv	ATGGCTCTGCCCCGCACCGCTCTGTGTGCTGCCACTGGCCCTGTGTGTGCACGCAGCAAGGCCAGAGG TGAACCTGGTGGAGTCCGGCGGGCGGCTGGTGAAGCCGCGGATCCCTGAGGCTGTCTTGGCAGGC AAGCGGCTTACCTTCAGCTACGCCGAGTGTGGTGGTGGCGCAGGCCCCCGGCAAGGGACTGGAG TGGGTGGGACGGATCAAGTCCATCGCAGAGCGGAGGAGCAACCGATTACGCAGCCCCCTGTGAGAAACA GGTTCACAATCTCCAGAGACGATTCAGGAATACCCTGTATCTGGAGATGCACTCTCTGAAGACAGA GGACACCGCCGTGTACTATTGCACCACAATCCCTGGCAACGACGCCCTTTGATATGTGGGGCCAGGGC ACAATGGTGAACCGTGAAGTCCGGCGGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAAGCG GGGCGGGCGGGCTCTGACATCGTGTGACACAGTCCCCACTGTCCCTGTCTGTGACCCCGGGCAGCC TGCAAGCATCTCCTGTAGATCTAGCCAGAGCCTGTGTACTCCAAACGGCAAGAATATCTGGATTGG TTCTTGACACAAGCCAGGCCAGTCTCCCCAGCTGTGTACTTACCCTGGGATCTAAATAGGGCAAGCGGAG TGCCAGACCGGTTCTCTGGAAGCGGATCCGGCATCGACTTCATCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGC CGAGGATGTGGGCGTGTACTATTGCATGCAGGCCAGCAGACACCCATCACCTTCGGCCAGGGCACA AGACTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 233)
32G8 scFv	ATGGCTCTGCCCCGCACCGCTCTGTGTGCTGCCACTGGCCCTGTGTGTGCACGCAGCAAGGCCAGAGG TGAACCTGGTGGAGTCCGGCGGGCGGCTGGTGAAGCCGCGGATCCCTGAGGCTGTCTTGGCAGGC AAGCGGCTTACCTTCAGCTACGCCGAGTGTGGTGGTGGCGCAGGCCCCCGGCAAGGGACTGGAG TGGGTGGGCGGATCAAGTCCATCACCGACGGAGGCGTGTATCGATTACGCAGCACCTGTGAGAAACA GGTGCACAATCTCCAGAGACGATTCAGGAATACCCTGTATCTGGAGATGCACTCTCTGAAGACAGA GGACACCGCCGTGTACTATTGTACCACAATCCCTGGCAACGACGATTTTCGATATGTGGGGCCAGGGC AGAATGGTGAACCGTGAAGTCCGGCGGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAAGCG GGGCGGGCGGGCTCTGACATCGTGTGACACAGTCCCCACTGTCCCTGTCTGTGACCCCGGGCAGCC TGCAAGCATCTCCTGTAGGTCTAGCCAGAGCCTGTGTACTCCAAACGGCAAGAATATCTGGATTGG TTTCTGCACAAGCCAGGCCAGTCTCCCCAGCTGTGTACTTACCCTGGGATCTAAATAGGGCAAGCGGAG TGCCAGACCGGTTCTCTGGAAGCGGATCCGGCATCGACTTCATCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGC AGAGGACGTGGGCGTGTACTATTGCATGCAGGCCAGCAGACACCCATCACCTTCGGCCAGGGCACA AGACTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 234)
26B9 scFv	ATGGCTCTGCCCCGCACCGCTCTGTGTGCTGCCACTGGCCCTGTGTGTGCACGCAGCAAGGCCAGAGG TGACACTGGTGGAGTCTTGGGCGTGTGGTGAAGCCGCGGATCTCTGAGGCTGAGCTGCCAGC ATCCGGCTTACCTTTAACAATGCCTGGATGTCCGGTGGCGCAGGCCCCCGGCAAGGGACTGGAG TGGATCGGCGGATCAAGAGCAAGTCCGACGGAGGAAACACAGATTACGCAGCACCTGTGAAGGACC

	GCTTCACAATCTCTCGGGACGATAGCAAGGATACCCTGTATCTGCAGATGAACGGCCTGAAGACAGA GGACACCCCGTGTACTTCTGCACCACAGCCCTGGCGGCCCTTTTGATTAATGGGGCCAGGGCACA CTGGTGTACCGTGTAGCTCCGGAGGAGGAGGAAGCGCGGAGGAGGCAGCGCGCGGCTCTGGCG GCGGGCCAGCGACATCGTGTGCACAGAGCCCTCTGTCCCTGCCAGTGACCCCCGGCGAGCCTGC CTCTATCAGCTGTCTGCTTACGACAGAGCCTGCTGCACCGGGACGGCTTCAATTACCTGGATTGGTTT CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCCAGCTGCTGATCTATCTGGCCTCCTTAGAGCCTCTGGCGTGC CAGACAGGTTCTCCGGCTCTGACAGCGGCACAGACTTACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGA GGATGTGGGCGTGTACTATTGCATGCAGGCCCTGCAGACACCCATCACCTTCGGCCAGGGCACAAGA CTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 235)
30D8 scFv	ATGGCTCTGCCCCGCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCAAGGCCTGAGG TGCAGCTGGTGGAGAGCGCGCGGCCCTGGTGAAGCCTGGCGGATCCCTGAGGCTGTCTTGGCAGGC AAGCGGCTTACCTTTAGCGACGCATGGATGTCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAG TGGGTGGGACGGATCAAGAGCAAGACAGACGGCGGCACCACAGATTACGTGGTGGCACTGAACGGCC GCTTCAATCATCTCCCGCGACGATTCTCGGAATACCCTGTATCTGCAGCTGAACAATCTGAAGACAGA GGATACCGCCGTGTACTATTGCACCACAGTGCAGGCTCCTACGGCTATTGGGGCCAGGGCACACTG GTGACCGTGTAGCTCCGGCGCGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAGCGGGGGCG GCGGCTGTGACATCGTGTGACACAGTCTCCACTGAGCCTGCCAGTGACCCCTGGCAGCCAGCCCTC CATCTCTGTCTGCTAGCCAGAGCCTGCTGCACAACAAGCGGAACAATACCTGGATTGGTTCTG CAGAAGCCTGGCCAGTCCCTCAGCTGCTGATCTATCTGGCCAGCAATAGAGCCTCCGGAGTGCAG ACAGGTTCTCTGGAGGAGGAAGCGGAACAGACTTACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGA CGTGGGCGTGTACTATTGCATGCAGGCCAGCAGACACCTATCACCTTCGGCCAGGGCACAAGACTG GAGATCAAG (SEQ ID NO: 236)
C6 scFv	ATGGCTCTGCCCCGCACCGCTCTGCTGCTGCCCTGCTGCTGCACGCAGCAAGGCCACAGG TGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCAGAGGTGAAGAAGCCTGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGC CTCCGGCGACACATTTCTTAGCAACGCAATCAGCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCCAGGGACTGGAG TGGATGGGCGTGTATCATCCCTATCTTCGGCACCGCGACTATGCCCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGA CAATCACCGCCGATGAGTCTACAAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCCCTCTCTGAGATCCGAGGACAC AGCCGTGTACTATTGTGCCAGGCACACCTATCACGAGTACCGAGGAGGATACATGGAGGAGCAATG GATCCTTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTAGCTCCGGCGCGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAA GCGGAGGAGGAGGAAGCGGGGGCGGGCTCTGAGCTGCAGAGCGTGTGACCCAGGCACCTTCCGC CTCTGGAACACCAGGCCAGAGGGTGAACATCAGCTGCTCCGGATCTAGCTCCAACATCGGCTCCAAT TACCTGTATTGGTACCAGCAGCTGCCAGGCACAGCCCCAAGATCCTGATCTACCGAACAATCAGC GGCCTTCTGGCGTGCAGATAGATTCTCTGGCAGCAAGTCCGGCACCTCTGCCAGCCTGGCAATCTC CGGCCTGAGGTTCTGAGGACGAGGCCGATTAATATTGGCCCGCTGGGACGATAACCTGAGCGGCTGG GTGTTTGGCACAGGCACCAAGCTGCAGTGTG (SEQ ID NO: 237)

Табл. 5С обеспечивает типичные нуклеотидные последовательности типичных EGFRvIII специфических CAR согласно настоящему изобретению.

Таблица 5С

Нуклеотидные последовательности типичных EGFRvIII специфических CAR

CAR	Нуклеотидная последовательность CAR	Компоненты
h62G7- L6/EQ	ATGGCTCTGCCCCGCACCGCTCTGCTGCTGCCCTGGCTCTGCTGCTG CACGCTGCTCGCCCTGATGTGGTCACTGACTCAGTCTCCCTGTCTCTG CCCCTCACCTTGGGACAGCCCGCCAGCATCTCCTGCAAGAGTCCCAG AGCCTGCTGTACTCCAACGGCAAGACCTATCTGAATTGGTTCCAGCAG AGACCCGGCCAGAGCCCTCGGAGACTGATCTACCAGGTGTCTAAGCTG GACAGCGGCGTGCCTGATCGCTTCTCTGGAAGCGGATCCGGAACCGAC TTTACACTGAAGATCAGCCGGTGGAGGCAAGGACGTGGGCGTGTAC TATTGGCGCCAGGATACCCACTTCCCACTGACATTTGGCGCGGCACC AAGGTGGAGATCAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGC GGCGGCGGCTCTGGCGGCGCGGCGAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGC GGAGCAGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCTTGTAA GCCAGCGGCTACACATTCACCGATTATACACTGCACTGGGTGCGGCAG GCCCTTGGCCAGGGACTGGAGTGGATGGGAGGAATCTGGCCTATCAC GGAGGAACACATCAACAGAGTTTAAGGGCAGAGTGACAATGACC AGGGACACATCTACCAGCACAGTGTATATGGAGCTGTCTAGCCTGCGC TCCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGGCGAGGCACAGGGA TCTTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGCAGTGTCTCTACCACAACCCCA GCACCAAGACCACCTACCCCTGCACCAACAATCGCCTCCCAGCCTCTG TCTCTGCGCCAGAGGCATGTAGGCCAGCAGCAGGAGGAGCAGTGCAC ACCAGGGGCTGGACTTTGGCCTGCGATATCTACATCTGGGCACCACTG GCAGGACATGTGGCGTGTCTGCTGAGCCTGGTCACTACCCCTGTAC	CD8α сигнальный пептид; h62G7-L6/EQ VL (Таблица 1 SEQ ID NO: 6); GS линкер [(GGGS) ₄ (SEQ ID NO: 202)]; h62G7-L6/EQ VH (Таблица 1 SEQ ID NO: 5); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен

	<p>TGCAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGACCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTGCTCCTGTAGGTTCCAGAGAAGAAGAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTTCCAGGCTGCCGATGCCAGCATACCCAGCAGGACAGAAATCAGCTGTAT AACGAGCTGAATCTGGGCAGGCGCGAGGAGTATGACGTGCTGGATAAGAGGAGAGGAAGGGACCCGTGAGATGGGAGGCAAGCCTAGGCGCAAGAACCACAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCCGAGCCATTCCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGAAGGGGCAAGGGCCACGACGGGCTGTACCAGGACTGTCAACCGCTACCAAGGATACTTACGACGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGGTGA (SEQ ID NO: 238)</p>	
42G9	<p>ATGGCTCTGCCCGTCAACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCAAGGCCCTCAGGTGACCCCTGAAGGAGAGCGGCCCTGCTGCTGCTGAAGCCAACAGAGACCCCTGACACTGACCTGCACAGTGTCTGGCTTCAGCCTGTCCAACCCCGGATGGGCGTGAGCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGTTCGCCACATCTTTTCTACCGATGAGAAGAGCCTGAAGCTGTCCCTGAGATCTAGGCTGACCCCTGAGCAAGGACACATCTAAGAGCCAGGTGGTGTGACCATGACAAACATGGCCCTGTGGACTCCGCCACATACTATTGGCCAGAGACAGCTCCAATTACGAGGGCTATTTCGACTTTTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGCAGTGTCTAGCGCGGGAAGGATCCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGGCGGCTCCGGCGGGCGGCGGCTCCGAGGTGGTGTGACCCAGAGCCCTGCCACACTGTCCGTGTCTCCAGCGAGAGAGCCACCCCTGTCTTGTAGGGCCAGCCAGTCCGTGCGCAGCAATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGTCCGGCCAGGCCCAAGACTGCTGATCTATGGCTCCACCATCAGGGCCACAGGAGTGCAGCAGCCTCTCTGGAAGCGGATCCGGCACAGAGTTTACCCTGACAATCTCCTCTGTGAGTCCGAGGATTTCCGCCGTGACTATTGCCAGCAGTACTCTGACTGCCCTCACCTTTGGCCCTGGCACAAAGGTGGATATCAAGACCACAACCCTGCACCAAGGCCACCAACCCAGCACCTACAATCGCAAGCCAGCCATGTGCCCTGAGACCCGAGGCCCTGTAGGCCCTGCAGCAGGAGGAGCAGTGACACCCGCGGCCCTGGACTTTGCCTGCGATATCTATACTGGGCACCACTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTCAATCACCCCTGTACTGCAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGATGGCTGCTCCTGTAGATTCCTGAGGAGGAGGAGGAGGATGTGAGCTGAGGGTGAAGTTTCTCGGAGCGCCGACGCACAGCATACCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACTGGGCCGAGAGAGGAGTACGACGTGTGGAT AAGAGGAGGGGAAGAGACCCAGAGATGGGAGGCAAGCCACGGAGAAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCCGAGGCCATTTCTGAGATCGGCATGAAGGGAGAGGGCGCCGGGCAAGGGACAGCGGACTGTACCAGGGACTGTCCACCGCAACAAAGGACCATATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGGTGA (SEQ ID NO: 239)</p>	<p>CD8α сигнальный пептид; 42G9 VH (Таблица 1 SEQ ID NO: 9); GS линкер; 42G9 VL (Таблица 1 SEQ ID NO: 10); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен</p>
32A10	<p>ATGGCTCTGCCCGTCAACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCAAGGCCACAGGTGACCCCTGAAGGAGTCCGGCCCGTGTGCTGTGAAGCCTACAGAGACCCCTGACACTGACCTGCACAGTGTCCGGCTTCCTCTGAGCAACGCCCGCATGGGCGTGTCTTGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCACATCTTTTCCACCGACGAGAAGTCTATCCGGAGAAGCCTGCGCTCCAGGCTGACCCCTGAGCAAGGATACATCCAAGTCTCAGGTGGTGTGACCATGACAAACATGGACCCCGTGGAT ACCGCCACATACTTCTGCGCCAGAGACAGCTCCAATTACGAGGGCTATTTTGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGCAGTGTCTAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCTGGCGGGCGGCTCTGGCGCGGCGGCGGACGCGGTGGTCAATGACCCAGAGCCACACACTGAGCGTGTCCCTGGCGAGAGGGTACCCCTGTCTGTAGGGCATCTCAGAGCGTGTCCCTAACTTCGCTGGTATCAGCAGAGACCAGGCCAGGCACCAAGGCTGTCTGTACGGAGCAACCAAGAGCCACAGGACTGCCCGGCAAGTTTCCGGATCTGGAAGCGGCACCGAGAATATCCTGACAATCAGCTCCCTG CAGTCTGAGGACTTCGCCATCTATTTTGGCCAGCAGTACAAGGATGGCCATTACCTTTGGCCCGGCGAGCAAGGTGGACATCAGAGCCACAACCCTGCACCAAGACCACCAACCCAGCACCTACAATCGCCTCTCAGCCTCTGAGCCTGCGCCAGAGGATGTAGGCCAGCAGCAGGAGGAGCAGTGACACAAGGGCCTGGACTTCGCTGCGATATCTATACTGGGCACCTCTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTCAATCACCCCTGTATGCAAGAGAGGACAGGAAGAAGCTGTGTACATCTCAAGCAGCCTTTATGCGCCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTCCGTTCCCTGAAGAGGAGGAGGGCGGCTGTGAGCTGAGAGTGAAGTTT</p>	<p>CD8α сигнальный пептид; 32A10 VH (Таблица 1 SEQ ID NO: 11); GS линкер; 32A10 VL (Таблица 1 SEQ ID NO: 12); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен</p>

	TCCAGGTC TGCCGATGCCCCAGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTG TACAACGAGCTGAATCTGGGCAGGCCGAGGAGTACGACGTGCTGGAT AAGAGGAGAGGAAGGGATCCAGAGATGGGAGGCAAGCCTAGGCCAAG AACCCACAGGAGGGCTGTATAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCC GAGGCC TACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGCGGAGAAGGGGCAAG GGACACGATGGCCTGTATCAGGGCCGTCTACCGCCCAAAAGGACACC TACGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGGTGA (SEQ ID NO: 240)	
20B9	ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTG CACGCAGCAAGACCTCAGGTGACCCCTGAAGGAGTCCGGCCCTGTGCTG GTGAAGCC AACAGAGACCTGACACTGACCTGCACAGTGTCTGGCTTC AGCCTGTCCAACGCAAGGATGGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCCT GGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGGCCACATCTTTAGCACCGACGAGAAG TCTTACAGCACATCCCTGAGAGGCAGGATCACCATCTCTAAGGATACA AGCAGAGGGCTGGTGGTGTGACCCCTGACAAACATGGACCCCGTGGAT ACCGCCACATACTATTGGCCAGGGACAGCTCCAATTACGAGGGCTAT TTCCGATTTTGGGGCCCTGGCTTCCGGTGACCGTGTCTAGCGCGCGG GGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGATCCGGCGCGCGG GGCTCTGAGATCGTGATGACCCAGTCCCCTGCCACACTGTCTGTGAGC CCAGGCGAGAGAGCCACCCCTGTCTTTGAGGGTGTCCAGTCTATCGGC GCCAATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGTTCCGGCCAGGCCCAAGGCTG CTCGATCTATGGAGCATCCACAGAGCCACAGGAATCCCCTGAGGTTTC TCCGGAGGAGGATCTGGAACCGAGTTTACCCCTGACAACTCTCCTCTCTG CAGAGCGAGGACTTTGCCATCTACTCCTGCCAGCAGTACATCTATTGG CCCTTCACATTTGGCCCTGGCACACAGTGGATATCAAGACCAACCA CCTGCACCAAGGCCACCAACCCAGCACCTACAATCGCAAGCCAGCCA TATAGCTGAGACCAGAGGCATGTAGGCCCTGCAGCAGGAGGCGCTG CACACCAGAGGCCCTGGACTTTGCCTGCGATATCTATACTGGGCACCA CTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTCAATCACCCCTG TACTGCAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTATATCTCAAGCAGCCC TTCAATGCGCCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGT CGGTCCCCTGAAGAGGAGGAGGGAGGATGTGAGCTGAGGGTGAAGTTT AGCCGGTCCGCCGATGCACCAGCATAACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTG TATAACGAGCTGAACTCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAT AAGAGGAGGGGAAGAGACCCAGAGATGGGAGGCAAGCCAGGAGAAAG AACCCTCAGGAGGGCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCC GAGGCC TATAGCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGGCCCGGGGCAAG GGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGTCCACCGCCCAAAGGACACC TATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGGTGA (SEQ ID NO: 241)	CD8α сигнальный пептид; 20B9 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 13); GS линкер; 20B9 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 14); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
14C11	ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTG CACGCAGCAAGACCCAGGTGACCCCTGAAGGAGAGCGGACCCGTGCTG GTGAAGCC TACAGAGACCTGACACTGACCTGCACAGTGTAGCGGCTTC TCCCTGAACAATGCAAGGATGGGCGTGTCTGGATCAGGCAGCCCCCT GGCAAGGCCCTGGAGTGGTTCGCCACATCTTTAGCACCGACGAGAAG TCCCTTCGCACATCTCTGAGAAGCAGGCTGACCCCTGAGCAAGGATACA AGCAAGTCCCAGGTGGTGTGACCATGACAAACATGGACCCCGTGGAT ACCGCCACATACTATTGGCCAGAGACAGCTCCAATTACGAGGGCTAT TTCCGATTACTGGGGCCAGGGCATCCTGGTGAACCGTGTCTAGCGCGCGG GGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGCGCGG GGCTCTGAGATCGTGATGACCCAGTCTCCCGCCACACTGTCTGTGAGC CCTGGCGAGAGAGCCACACTGAGCTGTAGGGCTCCCAGTCTGTGAGC AACAATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCAAGGCTG CTGATCTACGGAGCATCCACAGAGCCACAGGAGTGCACGCAAGGTTTC TCCGGATCTGACAGCGGCACCGAGTTTAGCCCTGACAACTCTCCTCTCTG CAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTTTGGCAGCAGTACAAGGATTTGG CCATTCACCTTTGGCCCGGCACAAAGGTGGAGATCAAGACCAACCA CCTGCACCAAGACCACCAACCCAGCACCTACAATCGCATCCAGCCT CTGTCTCTGAGACCAGAGGCATGTAGGCCAGCAGCAGGAGGAGCAGTG CACACCAGGGCCCTGGACTTTGCCTGCGATATCTATACTGGGCACCT CTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTCAATCACCCCTG TATTGCAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTCAAGCAGCCT TTTATGCGCCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTGTCTCTGT CGGTCCCCTGAAGAGGAGGAGGGAGGATGTGAGCTGAGGGTGAAGTTT TCCCGGCTCTGCCGATGCCCGCAGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTG TACAACGAGCTGAACTCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAT AAGAGGAGGGGAAGAGATCCAGAGATGGGAGGCAAGCCTCGGAGAAAG	CD8α сигнальный пептид; 14C11 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 15); GS линкер; 14C11 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 16); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен

	AACCCACAGGAGGGCTGTATAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCC GAGGCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGGCCCGGGCAAG GGACACGATGGCCGTATCAGGGCCGTCTACCGCCACAAGGACACC TACGATGCCCTGCATATGCAGGCAC TGCCCTCCAAGGTGA (SEQ ID No: 242)	
20E12	ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTG CACGCAGCAAGGCCAGAGGTGAACCTGGTGGAGTCCGGCGCGGCCTG GTGAAGCC TGCCGGATCCCTGAGGC TGCTTGGCAGGCAAGCGGCTTC ACCTTCAGTACGCCTGGATGTCCTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCAAG GGACTGGAGTGGGTGGGACGGATCAAGTCCATCGCAGACGGAGGAGCA ACCGATTACGCAGCCCTGTGAGAAACAGGTTCAAACTCTCCAGAGAC GATCTAGGAATACCTGTATCTGGAGATGCACTCTCTGAAGACAGAG GACACCGCGTGTACTATTGCACCACAATCCCTGGCAACGACGCTTT GATATGTGGGGCCAGGGCACAATGGTGACCGTGAGCTCCGGCGCGGC GGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGGGGCGCGGC TCTGACATCGTGCTGACACAGTCCCCACTGTCCCTGTCTGTGACCCCC CCAGACCGCTGCAAGCATCTCCTGTAGATCTAGCCAGAGCCTGCTGTAC TCCAACGGCAAGAATTATCTGGATTGGTTCCCTGCACAAGCCAGGCCAG TCTCCCCAGCTGCTGATCTACCTGGGATCTAATAGGGCAAGCGGAGTG CCAGACCGGTCTCTGGAAGCGGATCCGGCATCGACTTCATCC TGAAG ATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGATGTGGCGTGTACTATTGCATGCAG GCCCAGCAGACACCCATCACCTTCGGCCAGGGCACAAGACTGGAGATC AAGACCACAACCCAGCACCAAGGCCACCTACACCTGCACCAACCATC GCATCCAGCCACTGTCTCTGAGGCC TGAGGCATGTCCGGCCAGCAGCA GGAGGAGCAGTGCACACCCCGCGGCC TGACTTTGCCTGCGATATCTAC ATCTGGGCACCACTGGCAGGAACATGTGGCGTGCTGCTGTGAGCCTG TGATCACCTGTACTGCAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTATATC TTCAAGCAGCCTTTTATGAGACCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGAC GGCTGCTCCTGTAGGTTCCCTGAAGAGGAGGAGGGCGGCTGTGAGCTG AGAGTGAAGTTTTCTAGGAGCGCCGATGCACCAGCATAACCAGCAGGGA GAGAATCAGCTGTATAACGAGCTGAACTGCGGCCGGAGAGGAGAT GAGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGACCTTGAGATGGGAGGCAAG CCCCGGAGAAAGAACCCCTCAGGAGGGCCGTACAATGAGCTGCAGAAG GACAAGATGGCCGAGGCCATAGCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGG CGCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCGTACCAGGGCCGTCCACAGCC ACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGGCAC TGCCCTCCAAGG TGA (SEQ ID No: 243)	CD8 α сигнальный пептид; 20E12 VH (Таблица 1, SEQ ID No: 39); GS линкер; 20E12 VL (Таблица 1, SEQ ID No: 40); CD8 α петля; CD8 α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
32G8	ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTG CACGCAGCAAGGCCAGAGGTGAACCTGGTGGAGTCCGGCGCGGCCTG GTGAAGCC TGCCGGATCCCTGAGGC TGCTTGGCAGGCAAGCGGCTTC ACCTTCAGTACGCCTGGATGTCCTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCAAG GGACTGGAGTGGGTGGGCGGATCAAGTCCATCACCGACGGAGGCGTG ATCGATTACGCAGCACCTGTGAGAAACAGGTGCACAATCTCCAGAGAC GATCTAGGAATACCTGTATCTGGAGATGCACTCTCTGAAGACAGAG GACACCGCGTGTACTATTGTACCACAATCCCTGGCAACGACGATTT GATATGTGGGGCCAGGGCAGAATGGTGACCGTGAGCTCCGGCGCGGC GGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGGGGCGCGGC TCTGACATCGTGCTGACACAGTCCCCACTGTCCCTGTCTGTGACCCCC GGCAGCCCTGCAAGCATCTCCTGTAGGTTAGCCAGAGCCTGCTGTAC TCCAACGGCAAGAATTATCTGGATTGGTTTCTGCACAAGCCAGGCCAG TCTCCCCAGCTGCTGATCTACCTGGGATCTAATAGGGCAAGCGGAGTG CCAGACCGGTCTCTGGAAGCGGATCCGGCATCGACTTCATCC TGAAG ATCAGCCCGTGGAGGCGAGGACGTTGGCGTGTACTATTGCATGCAG GCCCAGCAGACACCCATCACCTTCGGCCAGGGCACAAGACTGGAGATC AAGACCACAACCCAGCACCAAGGCCACCTACACCTGCACCAACCATC GCATCCAGCCACTGTCTCTGAGGCC TGAGGCATGTAGGCCAGCAGCA GGAGGAGCAGTGCACACCAAGGCC TGACTTTGCCTGCGATATCTAC ATCTGGGCACCACTGGCAGGAACATGTGGCGTGCTGCTGTGAGCCTG GTATCACCTGTACTGCAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTATATC TTCAAGCAGCCTTTTATGAGACCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGAC GGCTGCTCCTGTAGGTTCCCTGAAGAGGAGGAGGGCGGCTGTGAGCTG AGAGTGAAGTTTTCTAGGAGCGCCGATGCACCAGCATAACCAGCAGGGA CAGAATCAGCTGTATAACGAGCTGAACTGCGGCCGGAGAGGAGGAT GACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGATCTGAGATGGGAGGCAAG CCCCGGAGAAAGAACCCCTCAGGAGGGCCGTACAATGAGCTGCAGAAG GACAAGATGGCCGAGGCCATAGCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGG	CD8 α сигнальный пептид; 32G8 VH (Таблица 1, SEQ ID No: 43); GS линкер; 32G8 VL (Таблица 1, SEQ ID No: 40); CD8 α петля; CD8 α ТМ; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен

	<p>CGCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCGTGACCAGGGCCGTGCCACAGCC ACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGG TGA (SEQ ID NO: 244)</p>	
<p>26B9</p>	<p>ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTG CACGCAGCAAGGCCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTTGGGGCGTGGTG GTGAAGCCTGGCGGATCTCTGAGGCTGAGCTGCGCAGCATCCGGCTTC ATCTTTAACAATGCCTGGATGTCCTGGGTGCCCCAGGCCCCCGCAAG GGA CTGGAGTGGATCGGCCGATCAAGAGCAAGTCCGACGGAGGAACC ACAGATTACGCAGCACCTGTGAAGGACCGCTTCAACAATCTCTCGGGAC GATAGCAAGGATACCCTGTATCTGCAGATGAACGGCCGAAGACAGAG GACACCGCCGTGTACTTCTGCACCACAGCCCTTGGCGGCCCTTTGAT TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGAAGTCCGGAGGAGGAGGA AGCGGGGAGGAGGACAGCGCGCGCGCGGCTCTGGCGCGCGCGGACG GACATCGTGTGACACAGAGCCCTCTGTCCCTGCCAGTGACCCCGGGC GAGCCTGCCTCTATCAGCTGTGCTCTAGCCAGAGCCTGTGTCACCGG GACGGCTTCAATTACCTGGATTGGTTTCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCC CCCAGCTGCTGATCTATCTGGCCTCCTCTAGAGCCTCTGGCGTGCCA GACAGGTTCTCCGGCTCTGACAGCGGCACAGACTTCACCCCTGAAGATC AGCAGAGTGGAGGCCGAGGATGTGGCGTGTACTATTGCATGCAGGCC CTGCAGACACCCATCACCTTCGGCCAGGGCACAAAGACTGGAGATCAAG ACCACAACCCAGCACCAAGGCCACCTACACCTGCACCAACCATCGCA TCCACAGCCTGTCTCTGAGACCTGAGGCCGTGAGGCCAGCAGCAGGA GGAGCAGTGCACACACAGGGCCCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATC TGGGCACCTCTGGCAGGAACATGTGGCGTGTGCTGTGAGCCCTGGTTC ATCACCCCTGACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGTGTATATCTTTC AAGCAGCCCTTTTATGAGACCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGC TGCTCCTGTAGGTTCCCTGAAGAGGAGGAGGGAGGATGTGAGCTGAGG GTGAAGTTTCCCGGCTGCGCATGCACAGCATACCAGCAGGGACAG AACAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGAGAGAGGAGTACGAC GTGCTGGA TAAGAGGCGCGGCAGAGATCCAGAGATGGCGCGCAAGCCC CGGAGAAAGAACCCTCAGGAGGGCCGTACAATGAGCTGCAGAAAGGAC AAGATGGCCGAGGCCATAGCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGGCGC CCGGCCAAGCCACACCATCCCTCTACCACGCCCTCTCCACAGCCACC AAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGGTGA (SEQ ID NO: 245)</p>	<p>CD8α сигнальный пептид; 26B9 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 41); GS линкер; 26B9 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 42); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен</p>
<p>30D8</p>	<p>ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTG CACGCAGCAAGGCCCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGCGCGCCCTG GTGAAGCCTGGCGGATCCCTGAGGCTGTCTTGCAGGCAAGCGGCTTC ACCTTTAGCGACGCATGGATGTCCTGGGTGCCCCAGGCCCTGGCAAG GACTGGAGTGGGTGGGACGGATCAAGAGCAAGACAGACGCGCGCACCC ACAGATTACGTGGTGCCACTGAACGGCCGCTTCATCATCTCCCGCGAC GATCTCTCGGAATACCCTGTATCTGCAGCTGAACAATCTGAAGACAGAG GATACCCCGTGTACTATTGCACCACAGTGCAGGCTCCTACGGCTAT TGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGAAGCTCCGGCGCGCGGCTCT GGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG ATCGTGATGACACAGTCTCCACTGAGCCTGCCAGTGACCCCTGGCGAG CCAGCCTCCATCTCTGTGCTCTAGCCAGAGCCTGTGTCACAACAAG CGGAACAATTACCTGGATTGGTTTCTGCAGAAGCCTGGCCAGTCCCT CAGCTGCTGATCTATCTGGCCAGCAATAGAGCCTCCGGAGTGCCAGAC AGGTTCTCTGGAGGAGGAAGCGGAACAGACTTCACCC TGAAGATCAGC AGAGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTATTGCATGCAGGCCAG CAGACACCTATCACCTTCGGCCAGGGCACAAAGACTGGAGATCAAGACC ACAACCCAGCACCAAGGCCACCTACACCTGCACCAACCATCGCTCC CAGCCTCTGTCTCTGAGACCAGAGGCATGTAGGCCAGCAGCAGGAGGA GCAGTGCACACCCAGGGCCCTGGACTTTGCC TGGATATCTACATCTGG GCACCTCTGGCAGGAACATGTGGCGTGTGCTGTGAGCCTGGTCAATC ACCCTGTACTGCAAGAGAGGCGAGGAAGAAGCTGTGTATATCTTCAAG CAGCCCTTCATGAGACCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGACGGCTGC TCTGTAGGTTCCCAAGAGGAGGAGGAGGAGGATGTGAGCTGAGGGTG AAGTTTAGCCGGTCCCGCATGCACAGCATACCAGCAGGGACAGAAC CAGCTGTA TAACGAGCTGAATCTGGGCCGAGAGAGGAGTACGACGTG CTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGATCCAGAGATGGGAGGCAAGCCTCGG AGAAAGAACCCACAGGAGGGCCGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAG ATGGCCGAGGCCATCTGTGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGCGCCGG GGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACAGCCACCAAG GACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGGTGA</p>	<p>CD8α сигнальный пептид; 30D8 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 37); GS линкер; 30D8 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 38); CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен</p>

	(SEQ ID NO: 246)	
C6	<p>ATGGCTCTGCCCGTCACCCGCTCTGCTGCTGCCCTCTGGCCCTGCTGCTG CACGCAGCAAGGCCACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCAGAGGTG AAGAAGCCTGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCTCCGGCGAC ACATTCTCTAGCAACGCAATCAGCTGGGTGCCCCAGGCCCCCTGGCCAG GGACTGGAGTGGATGGGCGTGATCATCCCTATCTTCGGCACCCGCCGAC TATGCCCAAGGTTTCAGGGCCGGGTGACAAATCACCCCGCATGAGTCT ACAAACACCCGCTACATGGAGCTGTCTCTCTGAGATCCGAGGACACA GCCGTGTACTATTGTGCCAGGCACACCTATCACGAGTACGCAGGAGGA TACTATGGAGGAGCAATGGATCCCTTGGGGACAGGGCACACTGGTGACC GTGAGTCCGGCGGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGA GGAAGCGGGGGCGGGCGGCTCTGAGCTGCAGAGCGTGTGACCCAGCCA CCTTCCGCTCTGGAACACCAGGCCAGAGGGTGACCAATCAGCTGCTCC GGATCTAGCTCCAACATCGGCTCCAATGACGTGATTTGGTACCAGCAG CTGCCAGGCACAGCCCCAAGATCCTGATCTACCGCAACAATCAGCGG CCTTCTGGCGTGCCAGATAGATTCTCTGGCAGCAAGTCCGGCACCTCT GCCAGCCTGGCAATCTCCGGCTGAGGTCTGAGGACGAGGCCGATTAC TATTGGCGCGCTGGGACGATAACCTGAGCGGCTGGGTGTTTGGCACA GGCACCAAGCTGACAGTGTGACCAACCCCTGCACCAAGACCACCA ACACCAGCACCTACCATCGCAAGCCAGCCACTGTCCCTGAGACCCGAG GCCTGTAGGCTGCAGCAGGAGGAGCAGTGCACACCAGGGGCTGGAC TTTGCCTGCGATATCTATATCTGGGCACCACTGGCAGGAACATGTGGC GTGCTGCTGTGAGCCTGGTCAATCCCTGTATTGCAAGAGAGGCAGG AAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTTATGCGCCCTGTGCAG ACAACCCAGGAGGAGGACGGTGCAGCTGTCCGTTCCAGAAAGAGGAG GAGGAGGATGTGAGCTGAGGGTGAAGTTTCCCGTCTGCCGATGCA CCAGCATACTAGCAGGGACAGAATCAGCTGTACAACGAGTGAATCTG GGCCGGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGAC CCTGAGATGGGAGGCAAGCCACGGAGAAAACCCCCAGGAGGGCCTGT ATAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCACTCTGAGATCG GCATGAAGGAGAGAGGGCGCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTATC AGGCCTGAGCACGCCACCAGGACACCTACGATGCCCTGCATATGC AGGCACTGCCTCCAAGGTGA</p> <p>(SEQ ID NO: 247)</p>	<p>CD8α сигнальный пептид; C6 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 48); GS линкер; C6 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 49); CD8α петля; CD8α TM; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен</p>

Понижающая регуляция или мутация целевых антигенов обычно наблюдается в раковых клетках, создавая клетки, варианты ускользания с потерей антигена. Таким образом, для противостояния "ускользания" опухоли и придания иммунной клетке большей специфичности к мишени, EGFRvIII специфические CAR может содержать один или несколько дополнительных внеклеточных лиганд-связывающих доменов, для одновременного связывания различных элементов в мишени, таким образом наращивая активацию и функционирование иммунной клетки. В одном варианте осуществления, внеклеточные лиганд-связывающие домены могут быть расположены последовательно на одном и том же трансмембранном полипептиде, и необязательно могут быть разделены линкером. В некоторых вариантах осуществления, указанные различные внеклеточные лиганд-связывающие домены могут быть помещены на различные трансмембранные полипептиды, составляющие CAR. В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к популяции CAR, где каждый CAR содержит различный внеклеточный лиганд-связывающий домен. В особенности, изобретение относится к способам конструирования иммунных клеток, включающих обеспечение иммунной клетки и экспрессирование на поверхности клетки популяции CAR, где каждый CAR содержит различный внеклеточные лиганд-связывающие домены. В другом предпочтительном варианте осуществления, изобретение относится к способу конструирования иммунной клетки, включающий обеспечение иммунной клетки и интродуцирование в клетку полинуклеотидов, кодирующие полипептиды, состоящие из популяции CAR, где каждый CAR содержит различные внеклеточные лиганд-связывающие домены. Под популяцией CAR, понимают по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть или больше CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лиганд-связывающие домены. Различные внеклеточные лиганд-связывающие домены в соответствии с изобретением могут предпочтительно одновременно связывать различные элементы в мишени, таким образом наращивая активацию и функционирование иммунной клетки. Изобретение также относится к выделенной иммунной клетке, которая содержит популяцию CAR, где каждый из которых содержит различные внеклеточные лиганд-связывающие домены.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает полинуклеотиды, кодирующие любые из CAR и полипептиды, описанные в настоящем изобретении. Полинуклеотиды могут быть получены и экспрессироваться с помощью процедур, известных в данной области техники.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает композиции (таких как фармацевтические композиции), содержащий любые из клеток согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий любые из CAR, описанные в настоящем изобретении.

Экспрессионные векторы, и введение композиции полинуклеотидов дополнительно описано в настоящем изобретении.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает способ получения любых полинуклеотидов, описанных в настоящем изобретении.

Полинуклеотиды, комплементарные к любым таким последовательностям, также охватываются

изобретением. Полинуклеотиды могут быть одноцепочечные (кодирующие или антисмысловые) или двухцепочечные, и могут представлять собой ДНК (геномные, кДНК или синтетические) или РНК молекулы. РНК молекулы включают ГяРНК молекулы, которые содержат интроны и соответствуют молекуле ДНК с отношением один к одному, и мРНК молекулы, которые не содержат интронов. Могут присутствовать дополнительные кодирующие или не кодирующие последовательности, но не обязательно, в пределах полинуклеотида согласно изобретению, и полинуклеотид, но не обязательно, может быть связан с другими молекулами и/или материалами подложки.

Полинуклеотиды могут содержать нативную последовательность (то есть эндогенную последовательность, которая кодирует антитело или его часть) или могут содержать вариант такой последовательности. Варианты полинуклеотидов содержат одну или несколько замен, добавлений, делеций и/или инсерций таким образом, что иммунореактивность кодируемого полипептида не снижена, относительно нативной иммунореактивной молекулы. Влияние на иммунореактивности кодируемого полипептида обычно может быть оценено, как описано в настоящем изобретении. Варианты предпочтительно проявляют по меньшей мере приблизительно 70% идентичность, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 80% идентичность, еще более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 90% идентичность, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 95% идентичность к полинуклеотидной последовательности, которая кодирует нативное антитело или его часть.

Две полинуклеотидные или полипептидные последовательности обозначаются как "идентичные", если последовательность нуклеотидов или аминокислот в двух последовательностях является такой же, при выравнивании для максимального соответствия, как описано ниже. Сравнение между двумя последовательностями обычно осуществляют путем сравнения последовательностей через окно сравнения для идентификации и сравнения локальных участков сходства последовательностей. "Окно сравнения", как используется в настоящем изобретении, относится к сегменту из по меньшей мере приблизительно 20 прилегающих положений, обычно от 30 до приблизительно 75, или от 40 до приблизительно 50, в котором последовательность может быть сравнена со эталонной последовательностью с таким же числом прилегающих положений после оптимального выравнивания двух последовательностей.

Оптимальное выравнивание последовательностей можно осуществлять, используя программу Megalign в комплекте Lasergene биоинформационного программного обеспечения (DNASTAR, Inc., Madison, WI), используя параметры по умолчанию. В этой программе реализованы несколько схем выравнивания, описанные в следующих ссылках: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. В Dayhoff, M.O. (ред.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC том 5, дополн. 3, сс. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis сс. 626-645 Methods in Enzymology том 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Предпочтительно, "процент идентичности последовательностей" определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей через окно сравнения из по меньшей мере 20 положений, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (то есть бреши) 20 процент или меньше, обычно от 5 до 15 процентов, или от 10 до 12%, по сравнению с эталонными последовательностями (которые не содержат добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентное значения высчитывают путем определения числа положений, в которых встречаются идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотных остатки в обеих последовательностях, получая число совпадающих положений, и деления числа совпадающих положений на общее число положений в эталонной последовательности (то есть размер окна) и умножая результат на 100 для получения процента идентичности последовательностей.

Варианты также могут, или альтернативно, быть по существу гомологичными к нативному гену, или его части или комплементу. Такие варианты полинуклеотидов способны гибридизироваться в умеренно жестких условиях к встречающейся в природе ДНК последовательности, кодирующей нативное антитело (или комплементарную последовательность).

Подходящие "умеренно жесткие условия" включают предварительную промывку в растворе 5 X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0); гибридизацию при 50-65°C, 5 X SSC, в течение ночи; с последующей двукратной промывкой при 65°C в течение 20 мин с каждым из 2X, 0,5X и 0,2X SSC, содержащим 0,1% SDS.

Как используется в настоящем изобретении, "высокие жесткие условия" или "условия высокой жесткости" представляют собой такие условия: (1) применяют низкую ионную силу и высокую температуру для промывки, например 0,015 M хлорид натрия/0,0015 M цитрат натрия/0,1% додецилсульфат натрия при 50°C; (2) при гибридизации применяют денатурирующий агент, такой как формамид, например, 50% (об./об.) формамид с 0,1% бычьим сывороточным альбумином/0,1% Ficoll/0,1% поливинилпирролидо-

ном/50 мМ фосфатно-натриевым буфером при pH 6,5 с 750 мМ хлоридом натрия, 75 мМ цитратом натрия при 42°C; или (3) применяют 50% формамид, 5 x SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М цитрат натрия), 50 мМ фосфат натрия (pH 6,8), 0,1% пиродифосфат натрия, 5 x раствор Денхардта, обработанную ультразвуком ДНК молот лосося (50 мкг/мл), 0,1% SDS, и 10% сульфат декстрана при 42°C, с промывкам и при 42°C в 0,2 x SSC (хлорид натрия/цитрат натрия) и 50% формамид при 55°C, с последующей промывкой высокой жесткости, включающей 0,1 x SSC, содержащий EDTA при 55°C. Для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятным, как корректировать температуру, ионную силу и др., что необходимо для приспособления к таким факторам, как длина зонда и др.

Для квалифицированного специалиста в данной области техники должно быть ясно, что в результате вырожденности генетического кода, существует много нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептид, как описано в настоящем изобретении. Некоторые из этих полинуклеотидов имеют минимальную гомологию к нуклеотидной последовательности любого нативного гена. Тем не менее, полинуклеотиды, которые отличаются вследствие различий используемых кодонов, специфически охватываются изобретением. Кроме того, аллели генов, содержащих полинуклеотидные последовательности, обеспечиваемые в настоящем изобретении, попадают под объем изобретения. Аллели представляют собой эндогенные гены, которые изменены в результате одной или нескольких мутаций, таких как делеции, добавления и/или замены нуклеотидов. Полученные мРНК и белок могут, но не обязательно, иметь измененную структуру или функцию. Аллели могут быть идентифицированы, используя стандартные техники (такие как гибридизация, амплификация и/или сравнение баз данных последовательностей).

Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть получены, используя химические синтезы, рекомбинантные методы или ПЦР. Методы химического синтеза полинуклеотидов хорошо известны в данной области техники и нет необходимости их более подробно описывать в настоящем изобретении. Квалифицированный специалист в данной области техники может использовать последовательности, обеспечиваемые в настоящем изобретении, и коммерческий синтезатор ДНК для получения желательной ДНК последовательности.

Для получения полинуклеотидов с использованием рекомбинантных методов, полинуклеотид, содержащий желательную последовательность, может быть вставлен в подходящий вектор, и вектор, в свою очередь, может быть введен в подходящую клетку-хозяин для репликации и амплификации, как более подробно обсуждается в настоящем изобретении. Полинуклеотиды могут быть вставлены в клетки-хозяева с помощью любых способов, известных в данной области техники. Клетки трансформируются путем введения экзогенного полинуклеотида путем прямого поглощения, эндоцитоза, трансфекции, F-скрещивания или электропорации. После введения, экзогенный полинуклеотид может быть поддерживаться в клетки в виде неинтегрированного вектора (такого как плаزمид) или интегрирован в геном клетки-хозяина. Таким образом амплифицированный полинуклеотид может быть выделен из клетки-хозяина с помощью методов, хорошо известных в данной области техники. См., например, Sambrook и др., 1989.

Альтернативно, ПЦР предоставляет возможность репродукции ДНК последовательностей. ПЦР технология хорошо известна в данной области техники и описана в патентах США №№ 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 и 4,683,202, а также в виде ПЦР: The Polymerase Chain Reaction, Mullis и др. eds., Birkauser Press, Boston, 1994.

РНК может быть получена, используя выделенную ДНК в подходящем векторе и встраивания ее в подходящую клетку-хозяин. Когда клетка реплицируется и ДНК транскрибируется в РНК, то затем РНК может быть выделена, используя методы, хорошо известные квалифицированному специалисту в данной области техники, как указано в Sambrook и др., 1989, выше, например.

Подходящие клонирующие векторы могут быть сконструированы в соответствии со стандартными техниками, или могут быть выбраны из большого числа клонирующих векторов, доступных в данной области техники. В то время как выбранный клонирующий вектор может изменяться в соответствии с клеткой-хозяином, в которой он будет использоваться, подходящие клонирующие векторы обычно имеют способность самореплицироваться, могут захватывать единичную мышью для предпочтительной рестрикционной эндонуклеазы, и/или могут нести гены для маркера, который может использоваться для селекции клонов, содержащих вектор. Подходящие примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например, pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и их производные, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ДНК фаги, и "челночные" векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие клонирующие векторы доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Strategene, и Invitrogen.

Экспрессионные векторы обычно представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат полинуклеотид в соответствии с изобретением. Подразумевается, что экспрессионный вектор должен быть реплицируемым в клетках-хозяевах либо в виде эписом или в виде интегральной части хромосомной ДНК. Подходящие экспрессионные векторы включают, но не ограничиваясь только ими, плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, ретровирусы, космиды, и экспрессионный(е) вектор(ы), описанные в РСТ публикации № WO 87/04462. Векторные компоненты в целом могут включать, но не ограничиваясь только ими, одну или несколько следующих структур: сигнальную последовательность; точку начала репликации; один или

несколько маркерных генов; подходящие транскрипционные контролирующие элементы (такие как промоторы, энхансеры и терминатор). Для экспрессии (то есть трансляции), также обычно необходимы один или несколько трансляционных контролирующих элементов, таких как сайты связывания рибосом, сайты инициации трансляции и стоп-кодоны.

Векторы, содержащие полинуклеотиды, представляющие интерес, могут быть введены в клетку-хозяин с помощью любого из различных подходящих методов, включая электропорацию, трансфекцию с применением хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана, или других веществ; бомбардировка микрочастицами; липофекция; и инфицирование (например, если вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус осповакцины). Выбор интродуцируемых векторов или полинуклеотидов часто будет зависеть от характерных особенностей клетки-хозяина.

Полинуклеотид, кодирующий EGFRvIII специфические CAR, раскрытые в настоящем изобретении, может существовать в виде экспрессионной кассеты или экспрессионного векторов (например, плазида для интродуцирования в бактериальную клетку-хозяин, или вирусный вектор, такой как бакуловирусный вектор для трансфекции клетки-хозяина насекомого, или плазида или вирусный вектор, такой как лентивирус, для трансфекции клетки-хозяина млекопитающих). В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид или вектор может включать нуклеотидную последовательность, кодирующую рибосомные перепрыгивающие последовательности, такие как, например, но не ограничиваясь только ими, последовательность, кодирующую 2A пептид. 2A пептиды, которые идентифицированы в подгруппе Афтовиров пикорнавирусов, вызывают "перепрыгивание" рибосомы из одного кодона на следующий без образования пептидной связи между двумя аминокислотами, кодируемыми кодонами (см. (Donnelly и Elliott 2001; Atkins, Wills и др. 2007; Doronina, Wu и др. 2008)). Под "кодоном" подразумеваются три нуклеотида на мРНК (или на смысловой цепи молекулы ДНК), которые транслируются рибосомой в один аминокислотный остаток. Таким образом, два полипептида может быть синтезировано из одной, непрерывной открытой рамки считывания в пределах имРНК, если полипептиды разделены 2A олигопептидной последовательностью, которая находится в рамке. Такие механизмы перепрыгивания рибосомой хорошо известны в данной области техники и известно использование нескольких векторов для экспрессии нескольких белков, кодируемых единичной матричной РНК.

Для нацеливания трансмембранных полипептидов в секреторный путь клетки-хозяина, в некоторых вариантах осуществления, обеспечивается секреторная сигнальная последовательность (также известная как сигнальный пептид, лидерная последовательность, препро последовательность или пре последовательность) в полинуклеотидной последовательности или векторной последовательности. Секреторные сигнальные последовательности функционально связаны с трансмембранной нуклеотидной последовательностью, то есть две последовательности соединены в правильную рамку считывания и ориентированы для нацеливания нового синтезированного полипептида в секреторный путь клетки-хозяина. Секреторные сигнальные последовательности обычно расположены на 5' для нуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес полипептид, хотя определенные секреторные сигнальные последовательности могут быть расположены в любом месте в представляющей интерес нуклеотидной последовательности (см., например, Welch и др., патент США № 5,037,743; Holland и др., патент США № 5,143,830). В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 206 или 214. Для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятно, что, учитывая вырожденность генетического кода, возможны значительные вариации последовательностей для этих полинуклеотидных молекул. В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидные последовательности согласно изобретению являются кодон-оптимизированными для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно для экспрессии в клетках людей. Кодон-оптимизация относится к обмену в представляющей интерес последовательности кодонов, которые обычно редко встречаются в экспрессируемых на высоком уровне генах данных видов на кодонах, которые обычно часто встречаются в экспрессируемых на высоком уровне генах таких видов, такие кодона кодируют идентичные аминокислоты, как и кодона, которые были заменены.

Способы конструирования иммунной клетки

В настоящем изобретении обеспечиваются способы приготовления иммунных клеток для применения в иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления, способы включают интродукцию CAR в соответствии с изобретением в иммунные клетки, и распространение клеток. В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к способу конструирования иммунной клетки, включающий: обеспечение клетки и экспрессирование на поверхности клетки по меньшей мере одного CAR, как описано выше. Способы конструирования иммунных клеток описаны, например, в опубликованных патентных заявках РСТ №№ WO/2014/039523, WO/2014/184741, WO/2014/191128, WO/2014/184744, и WO/2014/184143, каждая из которых включена в настоящую заявку полностью в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, способ включает: трансформацию клетки с помощью по меньшей мере одного полинуклеотида, кодирующего CAR, как описано выше, и экспрессию полинуклеотидов в клетках.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды присутствуют в лентивирусных векторах для стабильной экспрессии в клетках.

В некоторых вариантах осуществления, способ может дополнительно включать стадию генетической модификации клетки путем инактивирования по меньшей мере одного гена, экспрессирующего, например, но не ограничиваясь только ими, компонент TCR, мишень для иммуносупрессивного агента, HLA ген, и/или белок иммунной контрольной точки, такой как, например, PDCD1 или CTLA-4. Путем инактивации гена предполагается, что ген, представляющий интерес, не экспрессируется в форме функционального белка. В некоторых вариантах осуществления, ген, подвергаемый инактивации, выбирают из группы, включающей, например, но не ограничиваясь только ими, TCR α , TCR β , dCK, CD52, GR, PD-1 и CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления способ включает инактивацию одного или нескольких генов путем интродуцирования в клетки эндонуклеазы, осуществляющей расщепление в более редко расположенных сайтах, способной селективно инактивировать ген путем селективного расщепления ДНК. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, может представлять собой, например, эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALE-нуклеазу) или Cas9 эндонуклеазу.

В некоторых вариантах осуществления, дополнительный каталитический домен используют с эндонуклеазой, осуществляющей расщепление в более редко расположенных сайтах, для усиления его способности инактивировать целевые гены. Например, дополнительный каталитический домен может представлять собой ДНК концевой-процессирующий фермент.

Неограничивающие примеры ДНК концевых-процессирующих ферментов включают 5-3' экзонуклеазы, 3-5' экзонуклеазы, 5-3' щелочные экзонуклеазы, 5' вытесняемые эндонуклеазы, геликазы, фосфатазы, гидролазы и независимые от матрицы ДНК полимеразы. Неограничивающие примеры такого каталитического домена включают белковый домен или каталитически активное производное белкового домена, выбранное из группы, включающей hExoI (EXO1_HUMAN), ExoI дрожжей (EXO1_YEAST), E. coli ExoI, TREX2 человека, TREX1 мыши, TREX1 человека, бычий TREX1, крысиный TREX1, TdT (терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза) DNA2 человека, DNA2 дрожжей (DNA2_YEAST). В некоторых вариантах осуществления, дополнительный каталитический домен может иметь 3'-5'-экзонуклеазную активность, и в некоторых вариантах осуществления, указанный дополнительный каталитический домен представляет собой TREX, более предпочтительно TREX2 каталитический домен (WO 2012/058458). В некоторых вариантах осуществления, указанный каталитический домен кодируется одноцепочечным TREX полипептидом. Дополнительный каталитический домен может быть слитый с нуклеазным слитым белком или химерным белком. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный каталитический домен сливают, используя, например, пептидный линкер.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает стадию введения в клетки экзогенной нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере последовательность, гомологичную части целевой нуклеотидной последовательности, таким образом, что гомологичная рекомбинация происходит между целевой нуклеотидной последовательностью и экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления, указанная экзогенная нуклеиновая кислота содержит первую и вторую части, которые являются гомологичные участку 5' и 3' целевой нуклеотидной последовательности, соответственно. Экзогенная нуклеиновая кислота также может содержать третью часть, расположенную между первой и второй частью, которая не содержит гомологии между участками 5' и 3' целевой нуклеотидной последовательности. После отщепления целевой нуклеотидной последовательности, событие гомологичной рекомбинации стимулируется между целевой нуклеотидной последовательностью и экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления, гомологичные последовательности из по меньшей мере приблизительно 50 по, больше, чем приблизительно 100 по, или больше, чем приблизительно 200 по, можно использовать в пределах донорного матрикса. Экзогенная нуклеиновая кислота может иметь, например но не ограничиваясь только ими, от приблизительно 200 по до приблизительно 6000 по, более предпочтительно от приблизительно 1000 по до приблизительно 2000 по. Совместно используемые гомологии нуклеиновых кислот расположены в участках, фланкирующих против хода транскрипции и по ходу транскрипции сайт разрыва, и интродуцируемая нуклеотидная последовательность расположена между двумя плечами.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота последовательно содержит первый участок гомологии к последовательностям против хода транскрипции для указанного расщепления; последовательность для инактивации целевого гена, выбираемую из группы, включающей TCR α , TCR β , CD52, глюкокортикоидный рецептор (GR), дезоксицитидин киназу (dCK), и белок иммунной контрольной точки, такой как, например, запрограммированная гибель-1 (PD-1); и второй участок гомологии к последовательностям по ходу отщепления. Стадия интродукции полинуклеотида может быть одновременной, перед или после интродукции или экспрессии эндонуклеазы, осуществляющей расщепление в более редко расположенных сайтах. В зависимости от расположения целевой нуклеотидной последовательности, где происходит событие разрыва, такую экзогенную нуклеиновую кислоту можно использовать для "выключения" гена, например, если экзогенная нуклеиновая кислота расположена в пределах открытой рамки считывания гена, или для интродукции новых последовательностей или генов, представляющих интерес. Инсерции последовательностей путем использования такой экзогенной нуклеино-

вой кислоты, можно использовать для модификации целевого существующего гена, путем коррекции или замены гена (замена аллелей в качестве неограничивающего примера), или для повышенной или пониженной регуляции экспрессии целевого гена (обмена промоторов в качестве неограничивающего примера), коррекции или замены целевого гена. В некоторых вариантах осуществления, инактивацию генов, выбранных из группы, включающей $TCR\alpha$, $TCR\beta$, $CD52$, GR , dCK , и белки иммунной контрольной точки, можно осуществлять в точной локализации в геноме, нацеленной путем специфической TALE-нуклеазы, где указанная специфическая TALE-нуклеаза катализирует отщепление и где экзогенная нуклеиновая кислота последовательно содержит по меньшей мере участок гомологии и последовательность для инактивации одного целевого гена, выбранного из группы, включающей $TCR\alpha$, $TCR\beta$, $CD52$, GR , dCK , белки иммунной контрольной точки, которая интегрирована путем гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления, несколько генов могут быть, последовательно или одновременно, инактивированы путем использования нескольких TALE-нуклеаз соответственно и специфически нацеливания одного определенного гена и нескольких специфических полинуклеотидов для инактивации специфического гена.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает инактивацию одного или нескольких дополнительных генов, выбранных из группы, включающей $TCR\alpha$, $TCR\beta$, $CD52$, GR , dCK , и белки иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления, инактивацию гена можно осуществлять путем интродукции в клетки по меньшей мере одной эндонуклеазы, осуществляющей расщепление в более редко расположенных сайтах, такой как эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, специфически катализируемой расщепление в целевой последовательности клеточного генома; и необязательно, интродукции в клетки экзогенной нуклеиновой кислоты, последовательно содержащей первый участок гомологии к последовательностям против хода отщепления, последовательность, которую встраивают в геном клетки, и второй участок гомологии к последовательностям по ходу расщепления; где интродуцируемая экзогенная нуклеиновая кислота инактивирует ген и интегрирует по меньшей мере одну экзогенную полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один рекомбинантный белок, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления, экзогенная полинуклеотидная последовательность интегрируется в пределах гена, кодирующего белок, выбранный из группы, включающей $TCR\alpha$, $TCR\beta$, $CD52$, GR , dCK , и белок иммунной контрольной точки.

В другом аспекте, стадия генетической модификации клеток может включать: модификацию Т-клеток путем инактивации по меньшей мере одного гена, экспрессирующего мишень для иммуносупрессивного агента, и; распространения клеток, необязательно в присутствии иммуносупрессивного агента. Иммуносупрессивный агент представляет собой агент, который подавляет иммунную функцию с помощью одного из нескольких механизмов действия. Иммуносупрессивный агент может ослаблять распространение и/или "жадность" иммунной ответной реакции. Неограничивающие примеры иммуносупрессивных агентов включают ингибиторы кальциневрина, мишени рапамицина, блокаторы α -цепи интерлейкина-2, ингибиторы инозин-монофосфат-дегидрогеназы, ингибиторы редуктазы дигидрофолиевой кислоты, кортикостероиды и иммуносупрессивные антимаболиты. Некоторые цитотоксические иммунодепрессанты действуют путем ингибирования синтеза ДНК. Другие могут действовать путем активации Т-клеток или путем активации хелперных клеток. Способы в соответствии с изобретением предоставляют возможность придания иммуносупрессивной резистентности Т-клеткам для иммунотерапии путем инактивации иммуносупрессивного агента в Т-клетках. В качестве неограничивающих примеров, мишенями для иммуносупрессивного агента может являться рецептор для иммуносупрессивного агента, такой как, например, но не ограничиваясь только ими, $CD52$, глюкокортикоидный рецептор (GR), представители семейства генов $FKBP$, и представители семейства генов циклофилина.

В некоторых вариантах осуществления, генетическая модификация способа вовлекает экспрессию, в обеспеченные клетки для конструирования, одной эндонуклеазы, осуществляющей расщепление в более редко расположенных сайтах, такой как эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, специфически катализируемая отщепление в одном целевом гене, таким образом инактивируя целевой ген. В некоторых вариантах осуществления, способ конструирования клеток включает по меньшей мере одну из следующих стадий: обеспечение Т-клетки, такой как из культуры клеток или из образца крови; селекцию гена в Т-клетке, экспрессирующей мишень для иммуносупрессивного агента; интродукцию в Т-клетки эндонуклеазы, осуществляющей расщепление в более редко расположенных сайтах, способной селективно инактивироваться путем расщепления ДНК, предпочтительно путем двухцепочечного разрыва гена, кодирующей мишень для иммуносупрессивного агента, и распространения клеток, необязательно в присутствии иммуносупрессивного агента.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает: обеспечение Т-клетки, такой как из культуры клеток или из образца крови; селекцию гена в Т-клетке, где ген экспрессирует мишень для иммуносупрессивного агента; трансформацию Т-клетки с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей эндонуклеазу, осуществляющую расщепление в более редко расположенных сайтах, способной селективно инактивироваться путем расщепления ДНК, предпочтительно путем двухцепочечного разрыва гена, ко-

дирующего мишень для иммуносупрессивного агента, и экспрессирование эндонуклеаз, осуществляющих расщепление в более редко расположенных сайтах, в Т клетках; и распространения клеток, необязательно в присутствии иммуносупрессивного агента.

В некоторых вариантах осуществления, эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, специфически нацелена на CD52 или GR. В некоторых вариантах осуществления, ген, выбранный для инактивации, кодирует CD52, и иммуносупрессивная терапия включает гуманизованное антитело, нацеленное на CD52 антиген. В некоторых вариантах осуществления, ген, выбранный для инактивации, кодирует GR, и иммуносупрессивная терапия включает кортикостероид, такой как дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления, ген, выбранный для инактивации, является представителем семейства генов FKBP или его вариант и иммуносупрессивная терапия включает FK506, также известен как Такролимус или фуджимидин. В некоторых вариантах осуществления, представитель семейства генов FKBP представляет собой FKBP12 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, ген, выбранный для инактивации, является представителем семейства генов циклофилина или его вариант и иммуносупрессивная терапия включает циклоспорин.

В некоторых вариантах осуществления, эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, может представлять собой, например, мегануклеазу, нуклеазу "цинковых пальцев", или TALE-нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления, эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, представляет собой TALE-нуклеазу.

Также в настоящем изобретении обеспечиваются способы конструирования Т клеток, подходящих для иммунотерапии, где способы включают: генетическую модификацию Т клеток путем инактивации по меньшей мере одного белка иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления белок иммунной контрольной точки представляет собой, например, PD-1 и/или CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления, способы генетической модификации клетки включают: модификацию Т клеток путем инактивации по меньшей мере одного белка иммунной контрольной точки; и распространение клеток. Белки иммунной контрольной точки включают, но не ограничиваясь только ими, запрограммированную гибель 1 (PD-1, также известен как PDCD1 или CD279, номер доступа: NM_005018), Антиген 4 цитотоксического Т-лимфоцита (CTLA-4, также известен как CD152, номер доступа GenBank AF414120.1), LAG3 (также известен как CD223, номер доступа: NM_002286.5), Tim3 (также известен как HAVCR2, номер доступа GenBank: JX049979.1), BTLA (также известен как CD272, номер доступа: NM_181780.3), BY55 (также известен как CD160, номер доступа GenBank: CR541888.1), TIGIT (также известен как VSTM3, номер доступа: NM_173799), B7H5 (также известен как C10orf54, гомолог мышинного гена vista, номер доступа: NM_022153.1), LAIR1 (также известен как CD305, номер доступа GenBank: CR542051.1), SIGLEC10 (номер доступа GeneBank: AY358337.1), 2B4 (также известен как CD244, номер доступа: NM_001166664.1), которые непосредственно ингибируют иммунные клетки. Например, CTLA-4 представляет собой белок клеточной поверхности, экспрессируемый на определенных CD4 и CD8 Т клетках; когда, при захватывании его лигандами (B7-1 и B7-2) на антиген-презентирующих клетках, ингибируется активация и эффекторная функция Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, указанный способ конструирования клеток включает по меньшей мере одну из следующих стадий: обеспечение Т-клетки, такой как из культуры клеток или из образца крови; интродукцию в Т-клетки эндонуклеазы, осуществляющей расщепление в более редко расположенных сайтах, способной селективно инактивироваться путем расщепления ДНК, предпочтительно путем двухцепочечного разрыва одно гена, кодирующего белок иммунной контрольной точки; и распространение клеток. В некоторых вариантах осуществления, способ включает: обеспечение Т-клетки, такой как из культуры клеток или из образца крови; расщепление в более редко расположенных сайтах, способной селективно инактивироваться путем расщепления ДНК, предпочтительно путем двухцепочечного разрыва гена, кодирующего белок иммунной контрольной точки; экспрессирование эндонуклеаз, осуществляющих расщепление в более редко расположенных сайтах, в Т клетках; распространение клеток. В некоторых вариантах осуществления, эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, специфически нацеливает ген, выбранный из группы, включающей: PD-1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR α , и TCR β . В некоторых вариантах осуществления, эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, может представлять собой мегануклеазу, нуклеазу "цинковых пальцев", или TALE-нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления, эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, представляет собой TALE-нуклеазу.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение может быть особенно пригодно для аллогенной иммунотерапии. В таких вариантах осуществления, клетки могут быть модифицированы с помощью метода, включающего: инактивацию по меньшей мере одного гена, кодирующего компонент рецептора Т клеток (TCR) в Т клетках; и распространения Т клеток. В некоторых вариантах осуществления, генетическая модификация способа основывается на экспрессии, в клетках, обеспеченных для конструирования, одной эндонуклеазы, осуществляющей расщепление в более редко расположенных сайтах, таким образом, что эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, специфически катализирует отщепление в одном целевом гене, таким образом инактивируя целевой

QALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVV
 AIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQ
 RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDG
 GKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPQQ
 VVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLC
 QAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKPALE
 (SEQ ID NO: 220)

Повтор TRBC T01-R

NPQRSTVWYLTTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGK
 QALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVV
 AIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQ
 RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG
 GKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQ
 VVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLC
 QAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE T
 VQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN
 GGRPAALE (SEQ ID NO: 221)

Повтор TRBC T02-L

LTPQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRL
 LPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGK
 QALE TVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVV
 AIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQA
 HGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQ
 ALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG
 GKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQ
 VVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLC
 QAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKPALE
 (SEQ ID NO: 222)

Повтор TRBC T02-R

LTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRL
 LPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGK
 QALE TVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVV
 AIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQ
 RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG
 GKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQ
 VVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLC
 QAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKPALE
 (SEQ ID NO: 223)

Повтор CD52 T02-L

LTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRL
 LPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGK
 QALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVV
 AIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQ
 RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDG
 GKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPEQ
 VVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLC
 QAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKPALE
 (SEQ ID NO: 224)

Повтор CD52 T02-R

LTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRL
 LPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGK
 QALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVV
 AIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQ
 RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG
 GKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQ
 VVAIASNNGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLC
 QAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE TVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKPALE
 (SEQ ID NO: 225)

В другом аспекте, другая стадия генетической модификации клетки может представлять собой спо-

соб распространения TCR α дефицитных Т клеток, включающий интродукцию в Т-клетки рТ α (также известен как ргеTCR α) или его функционального варианта и распространение клеток, необязательно путем стимуляции CD3 комплекса. В некоторых вариантах осуществления, способ включает: а) трансформацию клеток с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере фрагмент рТ α для поддержания экспрессии CD3 на поверхности; б) экспрессирование указанного рТ α в клетках; и в) распространение клеток, необязательно путем стимуляции CD3 комплекса.

Также обеспечиваются способы получения Т клеток для иммунотерапии, включающие стадии способа, обеспечиваемого в настоящем изобретении, для распространения Т клеток. В некоторых вариантах осуществления, рТ α полинуклеотидная последовательность может быть интродуцирована случайным образом или путем гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления, инсерция может быть ассоциирована с инактивацией гена TCR α .

Можно использовать различные функциональные варианты рТ α . "Функциональный вариант" пептида относится к молекуле, по существу сходной либо с целым пептидом или его фрагментом. "Фрагмент" рТ α или его функциональный вариант относится к любому поднабору молекулы, которая представляет собой более короткий пептид, чем полноразмерный рТ α . В некоторых вариантах осуществления, рТ α или функциональные варианты могут представлять собой, например, полноразмерный рТ α или С-концевую усеченную рТ α версию. В С-концевом усеченном рТ α отсутствует на С-концевой области один или несколько остатков. В качестве неограничивающих примеров, в С-концевой усеченной рТ α версии отсутствуют 18, 48, 62, 78, 92, 110 или 114 остатков с С-конца белка. Варианты аминокислотной последовательности пептида могут быть приготовлены путем мутаций в ДНК, которая кодирует пептид. Такие функциональные варианты включают, например, делеции из, или инсерции или замены остатков в пределах аминокислотной последовательности. Любая комбинация делеции, инсерции и замены также может быть осуществлена для получения в конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желательной активностью, в особенности восстановлением функциональности CD3 комплекса. В предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере одну мутацию интродуцируют в различные рТ α версии, как описано выше, для воздействия на димеризацию. В качестве неограничивающего примера, мутированный остаток может представлять собой по меньшей мере W46R, D22A, K24A, R102A или R117A рТ α белка человека или выравненные положения, используя CLUSTALW метод на рТ α семействе или гомологичном представителе. Предпочтительно рТ α или его вариант, как описано выше, содержит мутированный остаток W46R или мутированные остатки D22A, K24A, R102A и R117A. В некоторых вариантах осуществления, указанный рТ α или варианты также слиты с доменом, передающим сигнал, таким как CD28, OX40, ICOS, CD27, CD137 (4-1BB) и CD8 в качестве неограничивающих примеров. Внеклеточный домен рТ α или варианты, как описано выше, могут быть слиты с фрагментом TCR α белка, в особенности трансмембранным и внутриклеточным доменом TCR α . рТ α варианты также могут быть слиты с внутриклеточным доменом TCR α .

В некоторых вариантах осуществления, рТ α версии могут быть слиты с внеклеточным лиганд-связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления, рТ α или его функциональный вариант слит с одноцепочечным фрагментом антитела (scFv), содержащим легкий и тяжелый переменный фрагмент и целевого антигена специфического моноклонального антитела, соединенный с помощью гибкого линкера.

Термин "TCR α дефицитная Т клетка" относится к выделенной Т клетке, в которой отсутствует экспрессия функциональной TCR α цепи. Это может быть осуществлено с помощью различных методов, в качестве неограничивающих примеров, путем конструирования Т клетки таким образом, что она не экспрессирует какой-либо функциональный TCR α на ее клеточной поверхности или путем конструирования Т клетки таким образом, что она продуцирует очень небольшое количество функциональной TCR α цепи на ее поверхности или путем конструирования Т клетки, которая экспрессирует мутированную или усеченную форму TCR α цепи. TCR α дефицитные клетки больше не могут распространяться с помощью CD3 комплекса. Следовательно, для преодоления этой проблемы и предоставления возможности пролиферации TCR α дефицитных клеток, рТ α или его функциональный вариант интродуцируют в клетки, таким образом восстанавливая функциональный CD3 комплекс. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает интродуцирование в указанные Т клетки эндонуклеаз, осуществляющих расщепление в более редко расположенных сайтах, способных селективно инактивироваться путем расщепления ДНК одного гена, кодирующего один компонент Т клеточного рецептора (TCR). В некоторых вариантах осуществления, эндонуклеаза, осуществляющая расщепление в более редко расположенных сайтах, представляет собой TALE-нуклеазу.

В другом аспекте, сконструированные Т клетки, полученные с помощью способов, описанных в настоящем изобретении, могут контактировать с биспецифическими антителами. Например, Т клетки могут контактировать с биспецифическими антителами *ex vivo* перед введением пациенту, или *in vivo* после введения пациенту. Биспецифические антитела содержат два переменных участка с различными антигенными свойствами, что облегчает приведение сконструированных клеток в непосредственную

близость к целевому антигену. В качестве неограничивающего примера, биспецифическое антитело может быть нацелено на опухолевый маркер и лимфоцитарный антиген, такой как, например, но не ограничиваясь только ими, CD3, и имеет способность перенаправлять и активировать любые циркулирующие Т клетки на опухоли.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, могут представлять собой мРНК, которую непосредственно интродуцируют в клетки, например путем электропорации. В некоторых вариантах осуществления, технологию cytoPulse можно использовать для временной пермеализации живых клеток для доставки материала в клетки. Параметры можно модифицировать для определения условий для более высокой эффективности трансфекции с минимальной гибелью.

Также в настоящем изобретении обеспечиваются способы трансформации Т клеток. В некоторых вариантах осуществления, способ включает: контактирование Т клетки с РНК и применение к Т клетке быстрой импульсной последовательности, включающей: (а) электрический импульс с напряжением в диапазоне от приблизительно 2250 до 3000 В на сантиметр; (б) ширину импульса 0,1 мс; (в) импульсный интервал приблизительно от 0,2 до 10 мс между электрическими импульсами стадии (а) и (б); (г) электрический импульс с напряжением в диапазоне от приблизительно 2250 до 3000 В с шириной импульса приблизительно 100 мс и импульсный интервал приблизительно 100 мс между электрическим импульсом стадии (б) и первый электрический импульс стадии (в); и (д) четыре электрических импульса с напряжением приблизительно 325 В с шириной импульса приблизительно 0,2 мс и импульсный интервал 2 мс между каждым из 4 электрических импульсов. В некоторых вариантах осуществления, способ трансформирования Т клетки, включающий контактирование указанной Т клетки с РНК и применение к Т клетке быстрой импульсной последовательности, включающей: (а) электрический импульс с напряжением приблизительно 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 или 3000 В на сантиметр; (б) ширину импульса 0,1 мс; (а) и импульсный интервал приблизительно 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мс между электрическими импульсами стадии (а) и (б); (г) один электрический импульс с напряжением в диапазоне от приблизительно 2250, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 или 3000 В с шириной импульса 100 мс и импульсный интервал 100 мс между электрическим импульсом стадии (б) и первый электрический импульс стадии (в); и (д) 4 электрических импульса с напряжением приблизительно 325 В с шириной импульса приблизительно 0,2 мс и импульсный интервал приблизительно 2 мс между каждым из 4 электрических импульсов. Любые значения, включенные в диапазон значений, описанный выше, раскрыты в настоящем изобретении. Среда для электропорации может представлять собой любую подходящую среду, известную в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, среда для электропорации имеет удельную электропроводимость в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 1,0 миллисименс.

В некоторых вариантах осуществления, в качестве неограничивающих примеров, РНК кодирует эндонуклеазу, осуществляющую расщепление в более редко расположенных сайтах, один мономер эндонуклеазы, осуществляющей расщепление в более редко расположенных сайтах, такой как полу-TALE-нуклеаза, CAR, по меньшей мере один компонент многоцепочечного химерного антигенного рецептора, рТ α или его функциональный вариант, экзогенную нуклеиновую кислоту, и/или один дополнительный каталитический домен.

Сконструированные иммунные клетки

Изобретение также обеспечивает сконструированные иммунные клетки, содержащие любые из CAR полинуклеотидов, описанных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, CAR может быть интродуцирован в иммунную клетку в качестве трансгена с помощью плазмидного вектора. В некоторых вариантах осуществления, плазмидный вектор также может содержать, например, селективный маркер, который обеспечивает идентификацию и/или отбор клеток, получивших вектор.

CAR полипептиды могут быть синтезированы *in situ* в клетке после интродукции полинуклеотидов, кодирующих CAR полипептиды, в клетку. Альтернативно, CAR полипептиды могут продуцироваться за пределами клеток, и затем интродуцироваться в клетки. Способы интродукции полинуклеотидной конструкции в клетки известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать подходящие методы трансфекции для интеграции полинуклеотидной конструкции в геном клетки. В других вариантах осуществления, методы транзиентной трансфекции можно использовать для транзиентной экспрессии полинуклеотидной конструкции, и полинуклеотидную конструкцию не интегрировать в геном клетки. В других вариантах осуществления, можно использовать методы, опосредованные вирусами. Полинуклеотиды могут быть интродуцированы в клетку с помощью любых подходящих способов, такие как, например, рекомбинантные вирусные векторы (например, ретровирусы, аденовирусы), липосомы и др. Методы транзиентной трансфекции включают, например, но не ограничиваясь только ими, микроинъекцию, электропорацию или бомбардировку частицами.

Полинуклеотиды могут быть включены в векторы, такие как, например, плазмидные векторы или вирусные векторы.

Также в настоящем изобретении обеспечиваются выделенные клетки и клеточные линии, получаемые с помощью вышеописанных способов конструирования клеток, обеспечиваемых в настоящем изобретении.

бретении. В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка содержит по меньшей мере один CAR, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка содержит популяцию CAR, где каждый CAR содержит различные внеклеточные лиганд-связывающие домены.

Также в настоящем изобретении обеспечиваются выделенные иммунные клетки, полученные в соответствии с любым из способов, описанных выше. Любая иммунная клетка, способная экспрессировать гетерологичные ДНК, может использоваться для целей экспрессии CAR, представляющих интерес. В некоторых вариантах осуществления, иммунная клетка представляет собой Т клетку. В некоторых вариантах осуществления, иммунная клетка может иметь происхождение из, например, но не ограничиваясь только ими, стволовой клетки. Стволовые клетки могут представлять собой стволовые клетки взрослых, стволовые клетки эмбрионов, отличающихся от человека, более предпочтительно нечеловеческие стволовые клетки, стволовые клетки пуповинной крови, клетки-предшественники, стволовые клетки костного мозга, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, тотипотентные стволовые клетки или гемопоэтические стволовые клетки. Репрезентативными клетками человека являются CD34+ клетки. Выделенная клетка также может представлять собой дендритную клетку, киллерную дендритную клетку, тучную клетку, NK-клетку, В-клетку или Т-клетку, выбранную из группы, включающей воспалительные Т-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты, регуляторные Т-лимфоциты, Т-лимфоциты памяти, или хелперные Т-лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления, клетка может иметь происхождение из группы, включающей CD4+ Т-лимфоциты и CD8+ Т-лимфоциты.

Перед распространением и генетической модификацией, источник клеток может быть получен от субъекта с помощью различных неограничивающих методов. Клетки могут быть получены из различных неограничивающих источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинная кровь, тимусная ткань, ткань из сайта инфекции, перитонеальный выпот, выпот в плевральной полости, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать любое количество Т клеточных линий, доступных и известных квалифицированному специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, клетки могут иметь происхождение от здорового донора, от пациента, у которого диагностировано злокачественное новообразование, или от пациента, у которого диагностирована инфекция. В некоторых вариантах осуществления, клетки могут быть частью смешанной популяции клеток, в которой присутствуют различные фенотипические характеристики.

Также в настоящем изобретении обеспечиваются клеточные линии, полученные из трансфектированной Т клетки в соответствии с любым из вышеописанных способов. Также в настоящем изобретении обеспечиваются модифицированные клетки, резистентные к иммуносупрессивной терапии. В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка в соответствии с изобретением содержит полинуклеотид, кодирующий CAR.

Иммунные клетки согласно изобретению могут быть активированы и распространены, либо перед или после генетической модификации Т клеток, используя способы, как в целом описано, например, но не ограничиваясь только ими, в патентах США №№ 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; и опубликованной заявке на патент США № 20060121005. Т клетки могут быть распространены *in vitro* или *in vivo*. В целом, Т клетки согласно изобретению могут быть распространены, например, путем контактирования с агентом, который стимулирует CD3 TCR комплекс и костимулирующей молекулой на поверхности Т клеток для создания активационного сигнала для Т клетки. Например, можно использовать химические вещества, такие как кальциевый ионофор A23187, форбол 12-миристанат 13-ацетат (PMA), или митогенные лектины, такие как фитогемагглютинин (PHA), для создания активационного сигнала для Т клетки.

В некоторых вариантах осуществления, популяции Т клеток можно стимулировать *in vitro* путем контактирования, например, с анти-CD3 антителом, или его антиген-связывающим фрагментом, или анти-CD2 антителом, иммобилизованным на поверхности, или путем контактирования с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с кальциевым ионофором. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т клеток, можно использовать лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяция Т клеток может контактировать с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом, в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т клеток. Условия, подходящие для культуры Т-клеток, включают подходящую культуральную среду (например, минимальную питательную среду или RPMI среду 1640 или X-Vivo 15, (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальную бычью сыворотку или сыворотку человека), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-2, IL-15, TGF β , и TNF, или любые другие добавки для роста клеток, известные квалифицированному специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваясь только ими, поверхностно-активное вещество, плазманат и восстановители, такие как N-ацетил- цистеин и 2-меркаптоэтанол. Питательные среды могут включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 10, и X-Vivo 20, Optimizer, с добавленными аминокислотами, пируват натрия, и витамины, либо без сыворотки или дополненные подходящим количеством сыворотки (или плаз-

мы) или определенный набор гормонов и/или количество цитокина(ов), достаточных для роста и распространения Т клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, но не в культуры клеток, которые будут инфузирова́ть субъекту. Целевые клетки поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, подходящей температуре (например, 37°C) и атмосфере (например, воздух плюс 5% CO₂). Т клетки, подвергаемые стимуляции в течение различного времени, могут проявлять различные характеристики.

В некоторых вариантах осуществления, клетки согласно изобретению могут распространяться путем совместного культивирования с тканями или клетками. Клетки также могут распространяться *in vivo*, например, в крови субъекта после введения клетки в субъект.

В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка в соответствии с настоящим изобретением содержит один инактивированный ген, выбранный из группы, включающей CD52, dCK, GR, PD-1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, HLA, TCR α и TCR β и/или, экспрессирует CAR, мульти-цепь CAR и/или рТ α трансген. В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка содержит полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, содержащие мультицепочечные CAR. В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка в соответствии с настоящим изобретением содержит два инактивированных гена, выбранных из группы, включающей: CD52 и GR, CD52 и TCR α , CDR52 и TCR β , GR и TCR α , GR и TCR β , TCR α и TCR β , PD-1 и TCR α , PD-1 и TCR β , CTLA-4 и TCR α , CTLA-4 и TCR β , LAG3 и TCR α , LAG3 и TCR β , Tim3 и TCR α , Tim3 и TCR β , BTLA и TCR α , BTLA и TCR β , BY55 и TCR α , BY55 и TCR β , TIGIT и TCR α , TIGIT и TCR β , B7H5 и TCR α , B7H5 и TCR β , LAIR1 и TCR α , LAIR1 и TCR β , SIGLEC10 и TCR α , SIGLEC10 и TCR β , 2B4 и TCR α , 2B4 и TCR β и/или экспрессирует CAR, мультицепочечные CAR и рТ α трансген.

В некоторых вариантах осуществления, TCR придает нефункциональность в клетки в соответствии с изобретением путем инактивации TCR α гена и/или TCR β гена(ов). В некоторых вариантах осуществления, обеспечивается способ получения модифицированных клеток, имеющих происхождение из индивидуума, где клетки могут пролиферировать независимо от пути передачи сигналов основного комплекса гистосовместимости (МНС). Модифицированные клетки, которые могут пролиферировать независимо от пути передачи сигналов МНС, и которые могут быть получены с помощью этого способа, охватываются объемом настоящего изобретения. Модифицированные клетки, раскрытые в настоящем изобретении, можно использовать для лечения пациентов, которые в этом нуждается, по отношению к отторжению "хозяин-против-трансплантата" (HvG) и реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD); следовательно, объемом настоящего изобретения охватывается способ лечения пациентов, которые в этом нуждается, по отношению к отторжению "хозяин-против-трансплантата" (HvG) и реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD, включающие лечение указанных пациентов путем введения указанному пациенту эффективного количества модифицированных клеток, содержащих инактивированные TCR α и/или TCR β гены.

В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки конструируют таким образом, чтобы они были резистентными к одному или нескольким химиотерапевтическим лекарственным средствам. Химиотерапевтическое лекарственное средство может представлять собой, например, аналог нуклеотида пурина (PNA), что, таким образом, делает иммунную клетку пригодной для лечения злокачественного новообразования, комбинируя адоптивную иммунотерапию и химиотерапию. Типичные PNA, например, клофарабин, флударабин, и цитарабин, отдельно или в комбинации. PNA метаболизируются с помощью дезоксицитидин-киназы (dCK) в моно-, ди-, и три-фосфатные PNA. Их три-фосфатные формы конкурируют с АТФ за ДНК синтез, действуя в качестве про-апоптотических средств, и являются эффективными ингибиторами рибонуклеотид-редуктазы (RNR), которая вовлечена в продукцию тринуклеотидов. В настоящем изобретении обеспечиваются EGFRvIII специфические CAR-Т клетки, содержащие инактивированный dCK ген. В некоторых вариантах осуществления, dCK "выключенные" клетки получают путем трансфекции Т клеток, используя полинуклеотиды, кодирующие специфическую ТАЛ-нуклеазу, нацеленную на dCK гены, путем, например, электропорации мРНК. dCK "выключенные" EGFRvIII специфические CAR-Т клетки являются резистентными к PNA, включая, например, клофарабин и/или флударабин, и поддерживая цитотоксическую активность Т-клеток по отношению к EGFRvIII-экспрессирующим клеткам. В другом примере, химиотерапевтическое лекарственное средство может представлять собой, например, CD52-нацеленную молекулу, такую как моноклональное анти-CD52 антитело (например, алектумумаб). CD52 представляет собой белок, присутствующий на поверхности лимфоцитов, и анти-CD52 антитела могут индуцировать апоптоз и лизис иммунных клеток путем антитело- и комплемент-зависимой цитотоксичности, что приводит к лимфоистощению. В настоящем изобретении обеспечиваются EGFRvIII специфические CAR-Т клетки, содержащие инактивированный CD52 ген. В некоторых вариантах осуществления, CD52 "выключенные" клетки получают путем трансфекции Т клеток, используя полинуклеотиды, кодирующие специфическую ТАЛ-нуклеазу, нацеленную на CD52 ген, путем, например, электропорации мРНК. CD52 "выключенные" EGFRvIII специфические CAR-Т клетки являются резистентными к анти-CD52 молекулам, включая, например, алектумумабу, и поддерживают цитотоксическую активность Т-клеток по отношению к EGFRvIII-экспрессирующим клеткам в присутствии анти-CD52 молекулы.

В некоторых вариантах осуществления, выделенные клетки или клеточные линии согласно изобретению может содержать рТ α или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка или клеточная линия может быть дополнительно генетически модифицирована путем инактивации TCR α гена.

В некоторых вариантах осуществления, CAR-T клетка содержит полинуклеотид, кодирующий суицидный полипептид, такой как, например RQR8. См., например, WO 2013153391 A, которая таким образом полностью включена в настоящую заявку в качестве ссылки. В CAR-T клетках, содержащих полинуклеотид, кодирующий суицидный полипептид, суицидный полипептид экспрессируется на поверхности CAR-T клетки. В некоторых вариантах осуществления, суицидный полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 226.

CPYSNP SLC SGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNP SLC SGGGGSP
APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLS LVITLYCNHRNRRRVCKCPRPW (SEQ ID NO: 226).

В некоторых вариантах осуществления, суицидный полипептид также может содержать сигнальный пептид на amino-конце. Если суицидный полипептид экспрессируется на поверхности CAR-T клетки, то связывание ритуксимаба с R эпитопами (то есть эпитопом, распознаваемым ритуксимабом -CPYSNP SLC (SEQ ID NO: 256))) полипептида вызывает лизис клетки. Более одной молекулы ритуксимаба может связываться на полипептид, экспрессируемый на клеточной поверхности. Каждый R эпитоп полипептида может связывать отдельную молекулу ритуксимаба. Делеция EGFRvIII специфических CAR-T клеток может происходить *in vivo*, например, путем введения ритуксимаба пациенту. Решение делегировать перенесенные клетки может быть обусловлено нежелательными эффектами, которые обнаружены у пациента, которые связаны с перенесенными клетками, такими как, например, при обнаруженных неприемлемых уровнях токсичности.

В некоторых вариантах осуществления, суицидный полипептид может содержать один, два, три или больше эпитопов, которые распознаются антителом (например, ритуксимабом).

В некоторых вариантах осуществления, суицидный полипептид может быть обеспечен в EGFRvIII специфической CAR T клетке в полипептиде, которые отделен от CAR-содержащего полипептида. В некоторых вариантах осуществления, суицидный полипептид может быть обеспечен в EGFRvIII специфической CAR T клетке в одной и той же полипептидной цепи, что и CAR полипептид. В CAR-содержащем суицидном полипептиде, типично суицидный полипептид обеспечен во внеклеточной части CAR.

В CAR-содержащем суицидном полипептиде, суицидный полипептид может содержать, например, одну или несколько копий аминокислотной последовательности эпитопа, распознаваемого ритуксимабом (CPYSNP SLC (SEQ ID NO: 256)). Суицидный полипептид может быть расположен в различных положениях в CAR. Например, суицидный полипептид может находиться на N-конце по отношению к scFv или он может находиться на C-конце по отношению к scFv в CAR. В некоторых вариантах осуществления, суицидный пептид может быть расположен между scFv и петлевым участком CAR. В некоторых вариантах осуществления, CAR может содержать более одного суицидного полипептида. Например, CAR может содержать суицидный полипептид N-конце по отношению к scFv и суицидный полипептид на C-конце по отношению к scFv. Каждый из этих полипептидов может содержать одну или несколько копий эпитопа, распознаваемого ритуксимабом. Например, CAR может содержать первый суицидный полипептид на N-концевом положении по отношению к scFv, где первый суицидный полипептид содержит одну копию эпитопа, распознаваемого ритуксимабом, и а второй суицидный полипептид на C-концевом положении по отношению к scFv, где второй суицидный полипептид содержит две копии эпитопа, распознаваемого ритуксимабом.

Также в настоящем изобретении обеспечиваются нуклеиновые кислоты, кодирующие EGFRvIII-специфические CAR, которые содержат суицидный полипептидную последовательность в CAR.

В примере, суицидный полипептид в одной и той же полипептидной цепи, что и EGFRvIII специфические CAR, может иметь последовательность, обозначенную в настоящем описании как "R2 суицидная последовательность". R2 суицидная последовательность содержит две копии эпитопа, распознаваемого ритуксимабом (CPYSNP SLC (SEQ ID NO: 256)). Такие EGFRvIII-специфические CAR могут обозначаться в настоящем изобретении как "EGFRvIII-R2 CAR". В табл. 5D представлены аминокислотные последовательности типичных EGFRvIII-R2 CAR согласно настоящему изобретению. В табл. 5D, сигнальная/лидерная пептидную последовательность выделена жирным шрифтом, GS линкер ((GGGS) $_4$ (SEQ ID NO: 202)) подчеркнута, и R2 суицидная последовательность выделена жирным шрифтом и подчеркнута. В табл. 5E представлены типичные нуклеотидные последовательности, кодирующие типичные EGFRvIII-R2 CAR согласно настоящему изобретению.

Аминокислотные последовательности типичных EGFRvIII специфических CAR с R2
суицидной последовательностью

CAR	Аминокислотная последовательность CAR	Компоненты (в порядке, с N-конца до C-конца)
14C11-R2	MALPVTALLLPLALLLHAARP QVTLKESGPVLVKPTE TLTLTCTVSGF SLNNARMGVSWIRQPPGKALEWFAHIFSTDEKSFRTSLRSRLT LSKDT SKSQVVLTMNMDPVDTATYYCARDSSNYEGYFDYWGGILVTVSSGG GGSGGGSGGGSGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVS NNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGVPARFSGSDSGTEFSLTISSL QSEDFAVYFCQQYKDWPF TFGPGTKVEIKGSGGGGSCPYSNP SLCSGG GGSCPYSNP SLCSGGGG TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYTWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLY IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNE LNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMGERRRGK GH DGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPP R (SEQ ID NO: 248)	CD8α сигнальный пептид; 14C11 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 15); GS линкер; 14C11 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 16); R2 суицидная последовательность; CD8α петля; CD8α TM; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
32A10-R2	MALPVTALLLPLALLLHAARP QVTLKESGPVLVKPTE TLTLTCTVSGF SLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSTDEKSI RRSLRSRLT LSKDT SKSQVVLTMNMDPVDTATYFCARDSSNYEGYFDYWGGTLVTVSSGG GGSGGGSGGGSGGGSEVVMQSPATLSVSPGERVTLSCRASQSVS SNFAWYQQRPGQAPRLLLYGATTRATGLPGRFSGSGSTENILTISSL QSEDFAIYFCQQYKDWPF TFGPGSKVDIKGSGGGGSCPYSNP SLCSGG GGSCPYSNP SLCSGGGG TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLY IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNE LNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMGERRRGK GH DGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPP R (SEQ ID NO: 249)	CD8α сигнальный пептид; 32A10 VH (Таблица 1 SEQ ID NO: 11); GS линкер; 32A10 VL (Таблица 1 SEQ ID NO: 12); R2 суицидная последовательность; CD8α петля; CD8α TM; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
26B9-R2	MALPVTALLLPLALLLHAARP EVQLVESWGVLVKPGGSLRLS CAASGF IFNNAWMSWVRQAPGKGLEWIGRIKSKSDGGT TDYAAPVKDRFTI SRD DSKDTLYLQMN LKTEDTAVYFCTTAPGGFDYWGGTLVTVSSGGGG SGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPSLPVT PGEFASISCRSSQSL LHR DGFNYLDWFLQKPGQSPQLLIY LASRASGV PDRFSGSDSGTDFTLKI SRVEAEDVGVY YCMQALQTPITFGQ GTRLEIK GGGGGSCPYSNP SLCSGGGGSCPYSNP SLCSGGGG TTTTAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGV LLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMGERRRGK GH DGLYQ LSTATKDTYDALHM QALPP (SEQ ID NO: 250)	CD8α сигнальный пептид; 26B9 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 41); GS линкер; 26B9 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 42); R2 суицидная последовательность; CD8α петля; CD8α TM; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен
30D8-R2	MALPVTALLLPLALLLHAARP EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS SCEASGF TFSDAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGT TDYVVPVPLNGRFI SRD DSRNTLYLQLN NKTEDTAVYYCTTVPGSYGYWGGTLVTVSSGGGG GGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSLPVT PGEFASISCRSSQSL LHNK RNNYLDWFLQKPGQSPQLLIY LASN RASGV PDRFSGGGSGTDF TLKIS RVEAEDVGVY YCMQALQTPITFGQ GTRLEIK GGGGGSCPYSNP SLCS GGGGSCPYSNP SLCSGGGG TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNE LNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMGERRRGK GH DGLYQGLSTATKDTYDALHM QAL PPR (SEQ ID NO: 251)	CD8α сигнальный пептид; 30D8 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 37); GS линкер; 30D8 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 38); R2 суицидная последовательность; CD8α петля; CD8α TM; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен

Нуклеотидные последовательности типичных EGFR VIII специфических CAR с R2
суицидной последовательностью

CAR	Нуклеотидная последовательность CAR	Компоненты
14C11-R2	<p>ATGGCACTGCCAGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTTGGCCCTGTGCTG CACGCAGCCAGACCCAGGTGACACTGAAGGAGAGCGGCCCGTGCTG GTGAAGCCTACAGAGACACTGACCCTGACCTGCACAGTGAGCGGCTTC TCCCTGAACAATGCAAGGATGGGCGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCT GGCAAGGCCCTGGAGTGGTTTCGCCACATCTTAGCACCGACGAGAAG TCCTTTCGCACATCTGTGAGAAGCAGGCTGACCCGTGAGCAAGGATACA AGCAAGTCCCAGGTGGTGTGCTGACCAATGACAAACATGGACCCCTGTGGAT ACCGCCACATACTATTGTGCCCGGGACAGCTCCAATTACGAGGGCTAT TTCGATTACTGGGGCCAGGGCATCCTGGTGACCGTGTCTAGCGGCGGC GGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGC GGCTGTGAGATCGTGATGACCCAGTCCCGACACTGTCTGTGAGC CCAGGAGAGAGAGCCACCCCTGTCTTGCAGGGCCCTCCAGTCTGTGAGC AACAACTGTGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCCCAAGGCTG CTGATCTACGGAGCAAGCACCAGAGCAACAGGAGTGCCTGCAAGGTTT TCCGGATCTGACAGCGGCACCGAGTTTCTCTGACAAATCTCCTCTCTG CAGAGCGAGGACTTCGCCGTGATTTTTGTGTCAGCAGTACAAGGATTGG CCATTCACCTTTGGCCCCGGCACAAAGGTGGAGATCAGGGCTCCGGGA GGAGGAGGATCCTGCCCTATTCCAACCCCTCTCTGTGTCAGCGGAGGA GGAGGAAGCTGTCCATACTCCAATCCCTCCCTGTGCTCCGGCGGCGGA GGATCCACCACAACCCAGCACCAGACCCCAACCCAGCACCACAACA ATCGCATCCAGCCTCTGTCTTGGCGCCCGAGGCATGCAGGCCAGCA TCAGCGCGGCCCGTGCACACCAGGGCCCTGGACTTTGCCCTGCCGATATC TATATCTGGGCACCACTGGCAGGAACTGTGGCGTGTCTGTGCTGAGC CTGGTCACTACCCCTGTATTGCAAGCGCGCCGGGAAGAAGCTGTGTAC ATCTTCAAGCAGCCTTTTATGCGCCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAG GACGGCTGCTCCTGTCCGTTCCCTGAAGAGGAGGAGGAGGATGTGAG CTGGCGGTGAAGTTTTTCCCGTCTGCCGATGCCCAAGCCTATCAGCAG GGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGGAG TACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGAGATCCCGAGATGGGAGGC AAGCCTCGGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCTGTATAATGAGCTGCAG AAGGACAAGATGGCCGAGGCCACTCTGAGATCGGCATGAAGGGAGAG AGGCGCCGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACC GCCACAAGGACACCTACGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCA AGGTGA (SEQ ID NO: 252)</p>	<p>CD8α сигнальный пептид; 14C11 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 15); GS линкер; 14C11 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 16); R2 суицидная последовательность; CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен</p>
32A10-R2	<p>ATGGCACTGCCAGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCTTGGCCCTGTGCTG CACGCAGCCAGACCCAGGTGACACTGAAGGAGTCCGGCCCGTGCTG GTGAAGCCTACAGAGACACTGACCCTGACCTGCACAGTGAGCGGCTTC TCTCTGAGCAACGCAAGGATGGGCGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCT GGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCACATCTTTCCACCGACGAGAAG TCTATCCGGAGAAGCCTGCGCTCCCGGCTGACCCGTGAGCAAGGATACA TCCAAGTCTCAGGTGGTGTGCTGACCAATGACAAACATGGACCCCTGTGGAT ACCGCCACATACTTCTGTGCCCGGGACAGCTCCAATTACGAGGGCTAT TTTTGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGAGGA GGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCAGGCGGCGGCGGCTTGGCGGCGGC GGCAGCGAGGTGGTCAATGACCCAGTCTCCAGCCACACTGAGCGTGTCC CCAGGAGAGCGGTGACCCGTGAGCTGCCGGGCTCTCAGAGCGTGTCC TCTAACTTCGCTGGTATCAGCAGCGGCCCGGACAGGCACCAAGGCTG CTGCTGTACGGAGCAACCAAGAGCAACAGGCCCTGCCTGGCAGGTTT</p>	<p>CD8α сигнальный пептид; 32A10 VH (Таблица 1 SEQ ID NO: 11) ; GS линкер; 32A10 VL (Таблица 1 SEQ ID NO: 12); R2 суицидная последовательность; CD8α петля; CD8α ТМ; 4-1ВВ сигнальный домен; CD3zeta сигнальный</p>

	<p>TCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGAGAATATCCTGACAATCAGCTCCCTG CAGAGCGAGGACTTCGCCATCTATTTTTGTGAGCAGTACAAGGATGG CCAATTCACCTTTGGCCCCGGCTCCAAGGTGGACATCAAGGGATCCGGA GGAGGAGGATCTTGCCCTATTC TAACCCTAGCCTGTGCTCCGGAGGA GGAGGATCCTGTCCATACTCTAATCCATCCCTGTGCAGCGGAGGAGGA GGATCTACCACAACCCAGCACCTAGACCACCAACCCAGCACCCACA ATCGCCTCTCAGCCTCTGAGCCTGCGCCAGAGGCATGCAGGCCAGCA GCAGGAGGAGCAGTGACACCCAGGGGCCCTGGACTTCGCCTGCGATATC TATATCTGGGCACCACTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGTGTCC CTGGTCATCACCTGTATTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTAC ATCTTCAAGCAGCCTTTTATGCGCCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAG GACGGCTGCAGCTGTCCGTTCCCTGAAGAGGAGGAGGGCGGCTGTGAG CTGAGAGTGAAGTTTTCCAGGTCTGCCGATGCCCCAGCCTATCAGCAG GGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCAGGCGGAGGAG TACGACGTGCTGGATAAGAGGAGAGGACCGCATCCCGAGATGGGAGGC AAGCCTAGGCGCAAGAACCCACAGGAGGGCCGTATAATGAGCTGCAG AAGGACAAGATGGCCGAGGCCACTCTGAGATCGGCATGAAGGGAGAG CGGAGAAGGGCAAGGGACACGATGGCCGTATCAGGGCCTGAGCACC GCCACAAGGACACCTACGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCA AGGTGA (SEQ ID NO: 253)</p>	<p>домен</p>
<p>26B9-R2</p>	<p>ATGGCCCTGCCAGTGACCGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTG CACGCCGCCAGACCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCTGGGGCGTGTG GTGAAGCCAGGAGGCTCTCTGAGGCTGAGCTGCGCAGCATCCGGCTTC ATCTTTAACAATGCCTGGATGTCCTGGGTGAGACAGGCACCCAGGCAAG GGCTTGGAGTGGATCGGCAGGATCAAGAGCAAGTCCGACGGAGGAACC ACAGATTACGCAGCACCCGTGAAGGACCGCTTCACAATCTCTCGGGAC GATAGCAAGGATACCTGTATCTGCAGATGAACGGCCTGAAGACAGAG GACACCGCCGTGACTTCTGCACCACAGCCCCAGGCGGCCCTTTGAT TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTGCCTGAGCTCCGGAGGAGGAGGA AGCGGCGGAGGAGGCAGCGGGCGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCGAGC GACATCGTGTGCACAGAGCCACTGTCCCTGCCTGTGACCCAGGA GAGCCCGCCTTATCAGCTGTGCTCTAGCCAGAGCCTGCTGCACCCG GACGGCTTCAATTACCTGGATTGGTTTTCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGC CCCAGCTGTGATCTATCTGGCCTCCTTAGAGCATCCCGAGTGCCT CACAGGTTCTCCGGATCTGACAGCGGCACAGACTTCACCTGAAGATC TCCCGGCTGGAGGCAGAGGATGTGGGCGTGTACTATTGCATGCAGGCC CTGCAGACACCAATACCTTCGGCCAGGGCACACGGCTGGAGATCAAG GGATCCGGAGGAGGAGGATCTTGCCCTACTCTAACCTAGCCTGTGTC AGCGCGGAGGAGGAGGATCTTGTCCATAATTCTAATCCAAGCCTGTGAGC GGGGAGGAGGAGGAGCACCACACCCCTGCACCAAGACCCCTACACCA GCACCTACCATCGCATCCAGCCACTGTCTCTGCGGCCGAGGCATGT AGCCAGCAGCAGGAGGAGCAGTGCACACCCAGGGGCCCTGGACTTTGCC TGCGATATCTACATCTGGGCACCACTGGCAGGAACATGTGGCGTGTG CTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAG CTGCTGTATACTTCAAGCAGCCTTTTATGCGCCAGTGCAGACAACC CAGGAGGAGGAGCGGCTGCTCCTGTAGGTGCCAGAAGAGGAGGAGGA GGATGTGAGCTGCGCGTGAAGTTTTCCCGGTCTGCCGATGCACCTGCA TACCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGG AGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGACCGGATCTTGAG ATGGGAGGCAAGCCCGGAGAAAGAACCTCAGGAGGGCCTGTACAAT GAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCATTCCGAGATCGGCATG AAGGGAGAGAGGCGCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCAAGGC CTGCTACAGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCACATGCAGGCC CTGCCACCAAGGTGA (SEQ ID NO: 254)</p>	<p>CD8α сигнальный пептид; 26B9 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 41); GS линкер; 26B9 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 42); R2 суицидная последовательность; CD8α петля; CD8α TM; 4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен</p>
<p>30D8-R2</p>	<p>ATGGCACTGCCAGTGACAGCCCTGCTGCTGCCCTGCTGCTG CACGCAGCCAGACCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTG GTGAAGCCAGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCAGGCCAGCGGCTTC ACCTTTAGCGACGCCCTGGATGTCCTGGGTGAGACAGGCACCCAGGCAAG GGCTTGGAGTGGGTGGGCAGGATCAAGAGCAAGACAGACGGCCGCCACC ACAGATTACGTGGTGCCTCTGAACGGCCGGTTCATCATCTCCCGCGAC GATCTCGGAATACCTGTATCTGCAGCTGAACAATCTGAAGACAGAG GATACCGCCGTGACTATTGCACCAAGTGCCTGGCTCCTACGGCTAT TGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGCAGCTCCGGCGGCGGCGGCTCT GGAGGAGGAGGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGCGGGGGCGGCGGCTGTGAC ATCGTGTATGACACAGTCTCCACTGAGCCTGCCAGTGCACCCAGGAGAG</p>	<p>CD8α сигнальный пептид; 30D8 VH (Таблица 1, SEQ ID NO: 37); GS линкер; 30D8 VL (Таблица 1, SEQ ID NO: 38); R2 суицидная последовательность; CD8α петля; CD8α TM;</p>

<p>CCTGCCTCCATCTCTGTGTCGCTCTAGCCAGTCCCTGCTGCACACAACAG CGGAACAATTACCTGGATTGGTTCCCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCC CAGCTGCTGATCTATCTGGCCAGCAATAGAGCCTCCGGAGTGCAGAC AGGTCTCTGGAGGAGGAAGCGGAACAGACTTCACCCCTGAAGATCAGC CGCGTGGAGGCAGAGGACGTGGGCGTGTACTATTGCATGCAGGCCAG CAGACACCCATCACCTTTGGCCAGGAACCCGGCTGGAGATCAAGGCC TCCGGAGGAGGAGGATCCTGCCCTTACTCCAACCCATCTCTGTGCAGC GGAGGAGGAGGATCTGTCCATATCCAAATCCTTCCCTGTGTGCCGGA CCTACCATCGCATCCCAGCCTCTGTCTCTGCGGCCCGAGGCATGTAGG CCAGCAGCAGGCGGCCCGTGCACACCAGGGGCCCTGGACTTTGCCTGC GATATCTACATCTGGGCACCACTGGCAGGAACATGTGGCGTGTCTG CTGTCTCTGGTCATCACCTGTACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTG CTGTATATCTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACAACCCAG GAGGAGGACGGCTGCAGCTGTCCGTTCCCTGAAGAGGAGGAGGGAGGA TGTGAGCTGGCGTGAAGTTTAGCCGGTCCGCCGATGCACCAGCATA CAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGA GAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGACGCGATCCTGAGATG GGAGGCAAGCCTCGGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCCTGTACAATGAG CTGCAGAAAGGACAAAGATGGCCGAGGCCATAGCGAGATCGGCATGAAG GGAGAGAGGGCCCGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTG TCCACAGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTG CCACCAAGGTGA (SEQ ID NO: 255)</p>	<p>4-1BB сигнальный домен; CD3zeta сигнальный домен</p>
---	--

Терапевтические применения

Выделенные клетки, полученные способами, описанными выше, или клеточные линии, имеющие происхождение из таких выделенных клеток, можно использовать в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления, такое лекарственное средство можно использовать для лечения злокачественного новообразования, включая солидные опухоли и жидкие опухоли. В некоторых вариантах осуществления, злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование, связанное с EGFRvIII, (например, любое злокачественное новообразование, экспрессирующее EGFRvIII) включая, но не ограничиваясь только ими, глиобластому (например, мультиформную глиобластому), анапластическую астроцитому, гигантоклеточную глиобластому, глиосаркому, анапластическую олигодендроглиому, анапластическую эпендимому, анапластическую олигоастроцитому, карциному хориоидного сплетения, анапластическую ганглиogliому, пинеобластому, пинеоцитому, менингиому, медуллоэпителиому, эпендимобластому, медуллобластому, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль, смешанную глиому, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, медуллобластому, рак ободочной и прямой кишки, рак анального канала, рак шейки матки, рак почки, рак кожи, рак поджелудочной железы, рак печени, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак щитовидной железы, мезотелиому, рак матки, лимфому, или лейкоз.

В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство, как описано в настоящем изобретении, может использоваться для 1) ингибирования роста или прогрессирования опухоли, у субъекта, который имеет злокачественные клетки, экспрессирующие EGFRvIII; 2) ингибирования метастазирования злокачественных клеток, экспрессирующих EGFRvIII, у субъекта; и 3) индуцирования регрессии опухоли у субъекта, который имеет злокачественные клетки, экспрессирующие EGFRvIII.

В некоторых вариантах осуществления, выделенная клетка в соответствии с изобретением, или клеточная линия, имеющая происхождение из выделенных клеток, может использоваться для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования у пациента, который в этом нуждается.

Также в настоящем изобретении обеспечиваются способы лечения пациентов. В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение иммунной клетки согласно изобретению пациенту, который в этом нуждается. В некоторых вариантах осуществления, способ включает стадию введения трансформированных иммунных клеток согласно изобретению пациенту, который в этом нуждается.

В некоторых вариантах осуществления, Т клетки согласно изобретению могут устойчиво подвергаться *in vivo* экспансии Т-клеток и могут персистировать в течение увеличенного периода времени.

Способы лечения согласно изобретению могут быть ослабляющими, лечебными или профилактическими. Способ согласно изобретению может быть либо частью аутологической иммунотерапии или частью аллогенного иммунотерапевтического лечения. Изобретение особенно пригодно для аллогенной иммунотерапии. Т клетки от доноров могут быть трансформированы в не-аллореактивные клетки, используя стандартные протоколы и репродуцироваться, при необходимости, таким образом продуцируя CAR-T клетки, которые могут вводиться одному или нескольким пациентам. Такая CAR-T клеточная терапия может быть предоставлена в виде "готового к использованию" терапевтического продукта.

Клетки, которые можно использовать в раскрытых способах, описаны, например, в предыдущем разделе. Лечение можно использовать для лечения пациентов, у которых был диагностировано, например, злокачественное новообразование. Злокачественные новообразования, которые можно лечить, включают, например, злокачественные новообразования, которые относятся к EGFRvIII, включая любые из вышеперечисленных злокачественных новообразований. Типы злокачественных новообразований,

подвергаемых лечению с помощью CAR и CAR-T клеток согласно изобретению, включают, но не ограничиваясь только ими, определенные жидкие и солидные опухоли, такие как мультиформная глиобластома, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак яичников и рак предстательной железы. Также охватываются опухоли/злокачественные новообразования у взрослых и опухоли/злокачественные новообразования у детей.

В некоторых вариантах осуществления, лечение может осуществляться в комбинации с одной или несколькими терапиями против злокачественного новообразования, выбранного из группы: терапия антителами, терапия конъюгатом антитело-лекарственное средство, химиотерапия, нацеленная терапия, терапия цитокинами, терапия вакциной, терапия онколитическим вирусом, терапия дендритными клетками, генная терапия, терапия наночастицами, гормональная терапия, хирургическая терапия, терапия лазерным излучением, лечение опухолевых участков и лучевая терапия. Например, CAR и CAR-T клетки согласно изобретению могут вводиться пациенту в сочетании с (например, перед, одновременно или после) 1) стандартного лечения, включая облучение, хирургическую резекцию, химиотерапию (например, темозоломид, прокарбазин, кармустин, ломустин, винкристин и др.), терапия антителами, такими как бевацизумаб, анти-ангиогенная терапия, и/или терапия опухолевых участков; 2) вакцины, включая EGFRvIII вакцину; 3) терапия конъюгатом антитело-лекарственное средство, включая, но не ограничиваясь только ими, конъюгаты лекарственных средств, которые нацелены на HER семейство рецепторов, таких как EGFR, HER2, HER3, и HER4; 4) нацеленная терапия, такая как ингибиторы киназы (например, эверолимус); и 5) иммунотерапии, включая, но не ограничиваясь только ими, анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-PD-L2, анти-41BB, анти-TIM3, анти-LAG3, анти-TIGIT, анти-OX40, анти-HVEM, анти-BTLA, анти-CB40, анти-CD47, анти-CSF1R, анти-CSF1, анти-MARCO, анти-IL8, анти-CXCR4, и анти-CTLA4 антитела.

В некоторых вариантах осуществления, лечение может вводиться пациентам, подвергаемым иммуносупрессивной терапии. Действительно, изобретение предпочтительно основано на клетках или популяции клеток, которым придана резистентность к по меньшей мере одному иммуносупрессивному агенту (например, циклоспорино, азатиоприну, метотрексату, микофенолату и FK506) благодаря инактивации гена, кодирующего рецептор для такого иммуносупрессивного агента. В этом аспекте, иммуносупрессивная терапия будет помогать селекции и экспансии T клеток в соответствии с изобретением в пациента. Введение клеток или популяции клеток в соответствии с изобретением может осуществляться любым подходящим образом, включая аэрозольную ингаляцию, инъекцию, проглатывание, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем изобретении, могут вводиться пациенту подкожно, интрадермально, интратуморально, интракраниально, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной или внутрелимфатической инъекции или интраперитонеально. В одном варианте осуществления, клеточные композиции согласно изобретению предпочтительно вводят путем внутривенной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления, лечение можно вводить пациентам, подвергаемым лимфоистощающей схеме. Истощение иммунных регуляторных элементов цитотоксическими агентами или облучением всего тела может усиливать противоопухолевую активность CAR и CAR-T клеток согласно настоящему изобретению. Например, цитотоксический агент в лимфоистощающей схеме включает, но не ограничиваясь только ими, флударабин, циклофосфамид, и/или алемтузумаб.

В некоторых вариантах осуществления введение клеток или популяции клеток может включать введение, например, от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^9 клеток на кг веса тела, включая все целые значения количества клеток в пределах этих интервалов. В некоторых вариантах осуществления введение клеток или популяции клеток может включать введение от приблизительно 10^5 до 10^6 клеток на кг веса тела, включая все целые значения количества клеток в пределах этих интервалов. Клетки или популяции клеток можно вводить в одной или нескольких дозах. В некоторых вариантах осуществления, указанное эффективное количество клеток может вводить в виде однократной дозы. В некоторых вариантах осуществления, указанное эффективное количество клеток может вводиться в виде более чем одной дозы в течение периода времени. Регулирование момента введения находится в компетенции лечащего врача и зависит от клинического состояния пациента. Клетки или популяцию клеток можно получать из любого источника, такого как банк крови или донор. Поскольку индивидуальные потребности отличаются, то определение оптимальных диапазонов эффективных количеств данного типа клеток для конкретного заболевания или состояния находится в компетенции квалифицированного специалиста в данной области техники. Эффективное количество обозначает количество, которое обеспечивает терапевтическое или профилактическое преимущество. Вводимая доза будет зависеть от возраста, здоровья и веса реципиента, вида сопутствующего лечения, если оно присутствует, частоты лечения и природы желательного эффекта. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество клеток или композиции, содержащее эти клетки, вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления, введение можно осуществлять путем внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления, введение может осуществляться путем прямой инъекции в опухоль.

Наборы

Изобретение также обеспечивает наборы для применения в способах согласно настоящему изобретению. Наборы согласно изобретению включают один или несколько контейнеров, содержащих поли-

нуклеотид, кодирующий EGFRvIII специфический CAR, или сконструированную иммунную клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий EGFRvIII специфический CAR, как описано в настоящем изобретении, и инструкции для применения в соответствии с любым из способов согласно изобретению, описанными в настоящем изобретении. В целом, эти инструкции содержат описание по введению сконструированной иммунной клетки для вышеописанных терапевтических лечений.

Инструкции относительно применения сконструированных иммунных клеток, как описано в настоящем изобретении, обычно включают информацию относительно дозировки, схемы дозирования и пути введения для предназначенного лечения. Контейнеры могут представлять собой единичные дозы, россыпные упаковки (например, многодозовые упаковки) или субъединичные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах согласно изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на метке или листке-вкладыше (например, листе бумаги, включенном в набор), но также приемлемыми машинно-распознаваемые инструкции (например, инструкции, находящиеся на магнитном или оптическом запоминающем диске).

Наборы согласно настоящему изобретению находятся в подходящих упаковках. Подходящие упаковки включают, но не ограничиваясь только ими, флаконы, бутылки, сосуды, гибкие упаковки (например, запечатанные майларовые или полиэтиленовые пакеты), и другие. Также охватываются упаковки для применения в комбинации со специфическим устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или инфузионное устройство, такое как миниасос. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с внутривенным раствором или флакон, имеющий пробку, поддающуюся прокалыванию с помощью иглы для подкожной инъекции). Контейнер также может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с внутривенным раствором или флакон, имеющий пробку, поддающуюся прокалыванию с помощью иглы для подкожной инъекции). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой EGFRvIII антитело. Контейнер может дополнительно содержать второй фармацевтически активный агент.

Наборы необязательно могут обеспечивать дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретируемую информацию. Обычно, набор содержит контейнер и метку или листы(ы)-вкладыш(и) на или связанные с контейнером.

Включенным в качестве ссылки в настоящую заявку для всех целей является содержимое предварительных заявок на патент США №№ 62/281,533 (поданной 21 января 2016 г.) и 62/431,758 (поданной 8 декабря 2016 г.).

Биологическое депонирование

Репрезентативные материалы согласно настоящему изобретению были задепонированы в Американской коллекции типовых культур, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA, в _____. Вектор ____ имеющий номер доступа ATCC №. ____ представляет собой полинуклеотид, кодирующий ____ вариабельную область легкой цепи, и вектор ____ имеющий номер доступа ATCC №. ____ представляет собой полинуклеотид, кодирующий ____ вариабельную область тяжелой цепи. Депонирования были осуществлены в соответствии с требованиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры и подзаконными актами (Будапештский договор). Это обеспечивает поддержание жизнеспособной культуры депозита в течение 30 лет от даты депонирования. Депозит будет представлен согласно ATCC на условиях Будапештского договора, и по согласованию между Pfizer, Inc. и ATCC, что гарантирует постоянную и неограниченную доступность потомства культуры депозита неограниченному кругу лиц при выдаче надлежащего патента США или при изложении неограниченному кругу лиц любой патентной заявки США или другой страны, в зависимости от того, что наступит раньше, и гарантирует доступность потомства специалисту, как определено согласно установленным правилам Руководителем патентного ведомства США по патентам и торговым маркам, имеющим полномочиям для этого, в соответствии с 35 U.S.C. § 122 и официальным правилам в соответствии с этим (включая 37 C.F.R. § 1.14 с особенной ссылкой на 886 OG 638).

Заявители настоящей заявки соглашаются, что если культура материалов при депонировании погибнет или будет потеряна или разрушена при культивировании в подходящих условиях, то материалы будут безотлагательно заменены по уведомлению на другие такие же. Доступность задепонированного материала не должна интерпретироваться как лицензия на реализацию изобретению в нарушение прав, гарантированных на основании любого правительства в соответствии с его патентным законодательством.

Последующие примеры представлены только с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения каким-либо образом. Более этого, различные модификации согласно изобретению дополнительно к тем, которые представлены и описаны в настоящем изобретении, будут понятными для квалифицированного специалиста в данной области техники на основании вышеприведенного описания и они охватываются объемом пунктов приложенной формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Определение аффинности для рекомбинантного Анти-EGFRvIII мышино-человеческого химерного антитела и гуманизированных антител.

В этом примере определяли аффинность химерных и гуманизированных анти-EGFRvIII антител

при 25°C и 37°C.

Анти-EGFRvIII мышинное (m) антитело, m62G7, созданное из гибридом, секвенировали и субклонировали в подходящих векторах для экспрессии в качестве мышинных-человеческих химерных антител. CDR мышинного антитела m62G7 прививали на человеческий каркас и экспрессировали в виде человеческого IgG1 рекомбинантного антитела, h62G7. Варианты аффинности h62G7 получали путем введения мутаций в CDR тяжелых и легких цепей. Аффинности рекомбинантного анти-EGFRvIII химерного антитела m62G7 и гуманизированных h62G7 антител измеряли на биосенсоре Biacore™ T200 поверхностного плазмонного резонанса, оборудованного сенсорным чипом CM4 высокой чистоты, соединенным с античеловеческим Fc (GE Healthcare Inc., Piscataway, NJ). Затем анти-EGFRvIII антитела захватывали античеловеческим Fc. После этого мономерный 8-гистидин меченный humEGFRvIII внеклеточный домен инъецировали в качестве анализа в сериях десятикратных разведений с максимальной концентрацией при 1000 нМ. Аффинность анти-EGFRvIII антител к humEGFRvIII измеряли при обеих температурах 25°C и 37°C (табл. 6). Ни одно из этих антител не проявило обнаруживаемого связывания с 1000 нМ 8-гистидин меченым рекомбинантным белком дикого типа EGFRwt в аналогичных условиях исследования.

В табл. 6, описаны варианты со ссылкой h62G7 на вариации тяжелой цепи, затем вариации легкой цепи. Например, клон антитела "h62G7-EQ/L6" относится к h62G7 клону, содержащему "EQ" вариацию в тяжелой цепи (также обозначается в настоящем изобретении как "h62G7-EQ") и "L6" вариацию в легкой цепи (также обозначается в настоящем изобретении как "h62G7-L6"). Эти аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи представлены в табл. 2. Также, в настоящем изобретении, h62G7 вариант может обозначаться либо с вариантом тяжелой цепи или легкой цепи, написанным первым - таким образом, например, "h62G7-EQ/L6" и "h62G7-L6/EQ" оба относятся к антителу, которое содержит h62G7-EQ тяжелую цепь и h62G7-L6 легкую цепь.

Таблица 6

Антитело	25°C			37°C		
	$k_a(1/Mc)$	$k_d(1/c)$	$K_D(нМ)$	$k_a(1/Mc)$	$k_d(1/c)$	$K_D(нМ)$
m62G7	7,30E+05	6,40E-02	88,7	8,00E+05	1,70E-01	207,0
h62G7-EQ/L6	2,40E+05	1,00E-02	43,8	6,60E+05	7,40E-02	112,8
h62G7-EQ/L1-DV	2,00E+05	1,20E-05	59,9	3,70E+05	6,90E-02	185,8
h62G7-H14/L1-DV	1,80E+04	2,00E-02	1087,9	6,60E+04	1,00E-01	1539,6
h62G7-H14/L6	1,30E+04	1,30E-02	992,2	4,30E+04	6,80E-02	1583,3

Пример 2. Определение аффинности для человеческих Анти-EGFRvIII Антител.

В этом примере определяли аффинность различных человеческих анти-EGFRvIII антител при 37°C.

Для создания человеческих антител к EGFRvIII, трансгенных мышей AlivaMab (Ablexis LLC, San Francisco, CA) иммунизировали по чередующейся схеме с помощью фиксированной параформальдегидом глиобластомной клеточной линии крыс, экспрессирующей EGFRvIII, F98-прEGFRvIII (Американская коллекция типовых культур, Manassas, VA) и пептиды (SEQ ID NO: 227: CGSGSGLEEKKGNYVVDH), направленные на стыковочный участок в EGFRvIII. Гибридомы получали, используя стандартные техники. Для определения аффинности связывания и специфичности этих гибридом к EGFRvIII, антитела в культуральных супернатантах захватывали с помощью анти-мышинного Fc, используя Biacore™ T200 биосенсор, оборудованный CM4 сенсорными чипами, связанными с антимышинным Fc (Biacore™ AB, Uppsala, Sweden - сейчас GE Healthcare). Затем мономерный 8-гистидин меченный humEGFRvIII внеклеточный домен инъецировали в качестве анализа в сериях десятикратных разведений с максимальной концентрацией при 1000 нМ. Аффинность анти-EGFRvIII антител к humEGFRvIII измеряли при 37°C (табл. 7). Ни одно из этих гибридомных антител не проявило обнаруживаемого связывания с 1000 нМ 8-гистидин меченым рекомбинантным белком дикого типа EGFRwt в аналогичных условиях исследования.

Таблица 7

Антитело	Связывание EGFRvIII при 37°C		
	$k_a(1/Mc)$	$k_d(1/c)$	$K_D(нМ)$
42G9	6,88E+04	5,63E-04	8,2
32A10	6,54E+04	6,26E-04	9,6
21E11	6,66E+04	6,32E-04	9,5
49B11	7,64E+04	6,95E-04	9,1
46E10	5,97E+04	7,16E-04	12,0
12H6	5,93E+04	7,33E-04	12,4

19A9	5,58E+04	1,04E-03	18,6
11B11	5,21E+04	1,13E-03	21,7
21E7	6,52E+04	1,30E-03	19,9
20B9	4,67E+04	1,50E-03	32,1
12B2	7,38E+04	1,79E-03	24,3
11F10	6,63E+04	2,81E-03	42,4
17G11	5,61E+04	3,00E-03	53,5
29D5	1,02E+05	4,24E-03	41,6
14C11	7,55E+04	5,93E-03	78,5
20E12	3,99E+04	1,41E-02	353,4
20G5	1,25E+05	2,89E-02	231,2
26B9	1,31E+05	3,20E-02	244,3
30D8	1,61E+05	2,77E-02	172,0
32G8	6,82E+03	1,22E-02	1788,9
34E7	3,77E+04	1,28E-02	339,5

Пример 3. Специфичность связывания Анти-EGFRvIII Антител к клеточным линиям, экспрессирующим EGFRvIII, с помощью проточной цитометрии.

В этом примере продемонстрировано клеточную специфичность связывания анти-EGFRvIII антител к клеткам, экспрессирующим EGFRvIII.

Для оценки клеточной специфичности связывания анти-EGFRvIII антител, полученных от AlivaMab мышей, использовали три изогенные крысиные глиобластомные клеточные линии и клеточную линию рака человека: F98 (не экспрессирует любой формы humEGFR), F98-EGFRwt (экспрессирует EGFR дикого типа), F98- μ EGFRvIII (экспрессирует EGFRvIII) и A431 (клеточная линия эпидермоидной карциномы со свех-экспрессией EGFR дикого типа), все получены от Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA). Для окрашивания клеток, 500 тыс. клеток инкубировали с 50 мкл гибридных супернатантов в течение 45 мин при 4°C, промывали буфером для связывания (PBS (Фосфатно-солевой буферный раствор) + 0,5% BSA (Бычий сывороточный альбумин)), с последующим инкубированием с FITC-конъюгированным козым анти-мышиним Fc специфическим антителом от Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). В табл. 8А и 8В представленные средние значения интенсивностей флуоресценции (MFI) EGFRvIII антител (за исключением клона 20G5) на EGFRvIII экспрессирующей клеточной линией были по меньшей мере в 10 раз выше, чем на не-экспрессирующих клеточных линиях. На фиг. 1А, фиг. 1В, и фиг. 1С представлены примеры FACS гистограмм связывания трех EGFRvIII специфических клонов, которые были клонировали и экспрессированы в качестве рекомбинантных человеческих IgG1 антител, 42G9 (фиг. 1А), 32A10 (фиг. 1В) и 32G8 (фиг. 1С), к трем F98 клеточным линиям.

Таблица 8А

Антитело	F98		F98-EGFRwt		F98-EGFRvIII		A431	
	MFI	% положительных	MFI	% положительных	MFI	% положительных	MFI	% положительных
Только 2-ое Ab	170	0,6	202	1,7	258	2,3	592	0,4
анти-EGFR(wt (дт) и vIII)	163	0,5	9608	98,3	5329	99,4	55240	100,0
42G9	159	0,4	185	1,6	3247	98,5	538	0,3
32A10	159	0,5	185	1,4	3349	98,3	531	0,2
21E11	159	0,3	184	1,3	3105	98,5	555	0,5
49B11	156	0,6	185	1,3	2980	98,5	599	0,8
46E10	158	0,4	187	1,6	2986	98,7	560	0,5
12H6	157	0,5	188	1,9	3445	98,3	569	0,8
19A9	158	0,5	168	1,6	3100	98,1	578	1,0
11B11	161	0,6	187	1,7	3391	98,2	589	1,2
21E7	159	0,3	184	1,3	3105	98,5	603	1,1
20B9	157	0,3	189	1,8	3418	98,3	558	0,7
12B2	156	0,4	185	1,5	2749	97,9	571	0,8
11F10	155	0,5	187	1,6	3283	98,0	582	1,1
17G11	157	0,6	184	1,5	3357	98,1	556	0,7
29D5	155	0,3	185	1,3	2829	97,9	531	0,4
14C11	157	0,4	185	1,3	3213	98,2	580	0,8

Таблица 8В

Антитело	F98		F98-EGFRwt		F98-EGFRvIII		A431	
	MFI	% положительных	MFI	% положительных	MFI	% положительных	MFI	% положительных
Только 2-ое Ab	235	0,2	252	0,2	322	1,3	185	0,7
анти-EGFR(wt (дт) и vIII)	245	0,3	6857	97,2	5827	99,4	44493	100,0
20E12	381	6,0	348	3,4	3976	97,9	302	2,6
20G5	1248	16,8	1070	12,6	4639	98,5	391	2,0
26B9	310	4,1	298	2,3	5405	98,6	276	1,7
30D8	296	4,0	280	1,7	5165	98,6	269	1,3
32G8	329	4,9	301	1,6	3734	98,6	271	1,2
34E7	485	6,9	371	4,0	4128	98,5	294	1,1

Эти результаты демонстрируют специфичность связывания анти-EGFRvIII антител к клеткам, которые экспрессируют EGFRvIII.

Пример 4. Определение аффинности для Полностью человеческих Анти-EGFRvIII Антител из Фаговой библиотеки.

В этом примере определяли аффинность различных человеческих анти-EGFRvIII антител при 25°C.

Человеческие анти-EGFRvIII антитела секвенировали и субклонировали в подходящих векторах для экспрессии в качестве рекомбинантных человеческих IgG1 антител. Аффинности антител измеряли при 25°C (табл. 9) на Biacore™ T200 биосенсоре поверхностного плазмонного резонанса, оборудованном CM4 сенсорным чипом, связанным с анти-человеческим Fc (GE Healthcare Inc., Piscataway, NJ). Анти-EGFRvIII антитела захватывали с помощью античеловеческого Fc. Затем мономерный 8-гистидин меченый humEGFRvIII внеклеточный домен инъецировали в качестве аналита при 10-кратных серийных разведениях, начиная при 1000 нМ. Из двух антител, только С6 проявило очень слабое, но обнаруживаемое связывание с 1000 нМ 8-гистидин меченным рекомбинантным белком дикого типа EGFRwt при 25°C.

Таблица 9

Антитело	Связывание EGFRvIII при 25°C		
	$k_a(1/Мс)$	$k_d(1/с)$	$K_D(нМ)$
B5	2,08E+04	1,41E-02	677,9
C6	1,68E+04	8,94E-03	532,1

Пример 5. Определение аффинности для рекомбинантных Одноцепочечных Fv форматированных Анти-EGFRvIII Антител.

В этом примере определяли аффинность различных рекомбинантных одноцепочечных Fv форматированных анти-EGFRvIII антител при 37°C.

Для превращения обычного антитела в одноцепочечный Fv (scFv) фрагмент, переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи соединяли вместе с помощью (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 202) линкера. Затем scFv фрагмент сливали с IgG1 Fc компонентом человека для облегчения рекомбинантной экспрессии и очистки. Аффинности scFv-Fc слитых белков измеряли при 37°C на Biacore™ T200 биосенсоре поверхностного плазмонного резонанса, оборудованном CM4 сенсорным чипом, связанным с античеловеческим Fc (GE Healthcare Inc., Piscataway, NJ) как описано выше. scFv-Fc белки захватывали с помощью анти-человеческого Fc. Затем мономерный 8-гистидин меченый humEGFRvIII внеклеточный домен инъецировали в качестве аналита при 10-кратных серийных разведениях, начиная при 1000 нМ. В табл. 10 показано, что scFv переформатированные слитые белки сохраняют связывание с EGFRvIII и что аффинности scFv-Fc белков в обеих HL (с переменным доменом тяжелой цепи на N-конце) и LH (с переменным доменом легкой цепи на N-конце) ориентациях были сравнимыми с их соответствующими частями обычного антитела, перечисленными в табл. 6, 7 и 9. Эти scFv-Fc белки также тестировали для определения связывания с 1000 нМ 8-гистидин меченным рекомбинантным белком дикого типа EGFRwt при 25°C, но ни один из них не проявил существенного связывания.

Таблица 10

scFv-Fc белок	Связывание EGFRvIII при 37°C		
	ka(1/Мс)	kd(1/с)	KD(нМ)
h62G7-L6/EQ	7,5E+05	7,6E-02	100,9
C6.HL	1,9E+04	2,0E-02	1063,8
14C11.HL	4,2E+04	4,3E-03	104,3
14C11.LH	4,8E+04	6,5E-03	136,0
20B9.HL	2,4E+04	1,8E-03	73,8
20B9.LH	3,0E+04	2,5E-03	82,7
32A10.HL	4,7E+04	1,2E-03	24,5
32A10.LH	4,1E+04	1,2E-03	29,8
42G9.HL	5,6E+04	1,1E-03	18,8
42G9.LH	4,0E+04	8,8E-04	22,1
26B9.HL	5,7E+04	4,0E-02	704,9
26B9.LH	6,9E+04	3,4E-02	494,2
30D8.HL	2,3E+05	5,3E-02	224,6
30D8.LH	1,1E+05	3,8E-02	348,6
20E12.HL	2,1E+04	1,9E-02	893,7
20E12.LH	1,6E+04	1,5E-02	932,5
32G8.HL	8,7E+03	1,3E-02	1490,0

Пример 6. Получение и обнаружение Т клеток с EGFRvIII специфическим химерным антигенным рецептором (CAR).

В этом примере определяли экспрессию и специфичность связывания антигена EGFRvIII специфическими CAR Т клетками.

PBMC от здоровых доноров, получаемые от AllCells (Alameda, CA), размораживали в соответствии с указаниями производителя и культивировали в течение ночи в X-Vivo™-15 среде (Lonza, Walkersville, MD), дополненной 5% сывороткой крови человека. Т клетки активировали в течение 3 дней в X-Vivo™-15 среде (Lonza), дополненной 20 нг/мл IL-2 человека, 5% сывороткой крови человека, и Dynabeads Human T активатором CD3/CD28 при соотношении частицы: клетки 1:1 (Life Technologies, Carlsbad, CA). Затем Т клетки трансдуцировали с помощью бицистронного лентивирусного вектора, в который встроена BFP-T2A-EGFRvIII специфическая CAR экспрессионная кассета под контролем EF1α промотора при множественности заражения (MOI) 5. В этом конструкте, EGFRvIII специфический CAR совместно экспрессировались с BFP (синий флуоресцентный белок), для облегчения обнаружения EGFRvIII специфических CAR. EGFRvIII специфические CAR содержали VH и VL последовательности различных анти-EGFRvIII клонов (h62G7-L6/EQ, 14C11, 20B9, 32A10, 42G9, C6, 20E12, 26B9, 30D8, и 32G8; описанные в другом месте в настоящем изобретении). CAR Т клетки поддерживали в культуре вплоть до 14 дней после трансдукции. Процент клеток, экспрессирующих EGFRvIII специфические CAR, мониторили в динамике (в день 4, 9, и 14 после лентивирусной трансдукции первичных Т клеток) путем проточной цитометрии, используя BFP (синий флуоресцентный белок) для обнаружения (фиг. 2A) (определенные путем процента BFP положительных жизнеспособных клеток).

Для определения целевой специфичности связывания CAR, рекомбинантные белки EGFRvIII-mFc и EGFR-mFc, которые содержат внеклеточный домен либо humEGFRvIII или EGFR человека дикого типа, соответственно, слитый с мышиным IgG1-Fc доменом, продуцировали в HEK293 клетках. Целевую специфичность связывания определяли путем инкубирования различных EGFRvIII специфических CAR Т клеток либо с EGFRvIII-mFc или EGFR-mFc белком, затем с помощью PE-меченного козьего анти-мышинного Fc вторичного антитела (Jackson ImmunoResearch) и анализировали с помощью проточной цитометрии в День 4 после трансдукции Т клеток векторами, кодирующими CAR, содержащие различные EGFRvIII специфические клоны (h62G7-L6/EQ, 14C11, 20B9, 32A10, 42G9, C6, 20E12, 26B9, 30D8, и 32G8). Как показано на Фиг. 2B, CAR Т клетки, содержащие VH и VL последовательности клонов h62G7-L6/EQ, 14C11, 20B9, 32A10, 42G9, 20E12, 26B9, и 30D8 связываются с EGFRvIII-mFc, но существенно не связываются с EGFR-mFc. В День 14 после трансдукции, определяли корреляцию CAR экспрессии, как обнаружено с помощью BFP, в клетках и связывание рекомбинантного EGFRvIII-mFc клетками. Репрезентативный набор данных представлен на фиг. 2C, на которой показана экспрессия CAR, содержащих десять различных EGFRvIII специфических клонов (h62G7-L6/EQ, 14C11, 20B9, 32A10, 42G9, C6, 20E12, 26B9, 30D8, и 32G8) в CAR Т клетках в День 14 после трансдукции, как определено с помощью BFP обнаружения в клетках и связывания клетками рекомбинантного EGFRvIII-mFc.

Эти результаты свидетельствуют о том, что CAR Т клетки, содержащие CAR, включающие VH и VL последовательности клонов h62G7-L6/EQ, 14C11, 20B9, 32A10, 42G9, 20E12, 26B9, и 30D8, связываются с EGFRvIII-mFc, но существенно не связываются с EGFR-mFc.

Пример 7. Целевое зависимое и независимое дегранулирование EGFRvIII специфических CAR T клеток.

В этом примере определяли дегранулирующую активность EGFRvIII специфических CAR T клеток в присутствии и отсутствии целевой экспрессии злокачественных клеточных линий.

Пять клеточных линий использовали для оценки дегранулирующей активности CAR T клеток. Клеточную линию рака легких человека NCI-H522 и глиобластомную клеточную линию U87MG получали от Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA) и культивировали в RPMI 1640 среде, дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (Mediatech Inc., Manassas, VA). Поскольку большинство злокачественных клеточных линий не экспрессируют EGFRvIII, NCI-H522 (которая не экспрессирует обнаруживаемый уровень EGFR дикого типа или EGFRvIII) трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим полноразмерный EGFRvIII ген (SEQ ID NO: 201) для получения "NCI-H522-EGFRvIII", которая экспрессирует низкий уровень EGFRvIII. Для создания изогенных глиобластомных человеческих клеточных линий, которые экспрессируют различные EGFR белки, эндогенный ген EGFR дикого типа U87MG сначала "отключали" для создания EGFR-нулевой клеточной линии "U87-KO". Затем U87-KO клетки трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим полноразмерный ген EGFR дикого типа (номер доступа NP_005219), для получения клеточной линии, сверхэкспрессирующей EGFR, "U87-KO-EGFRwt". Подобным образом, "U87-KO-EGFRvIII" (которая сверхэкспрессирует EGFRvIII), получали из U87-KO путем лентивирусной трансдукции с помощью вектора, кодирующего полноразмерный ген EGFRvIII (SEQ ID NO: 201).

Для анализа дегранулирования, 100 тыс. T-клеток, экспрессирующих различные EGFRvIII специфические CAR (содержащие клоны h62G7-L6/EQ, 14C11, 20B9, 32A10, 42G9, C6, 20E12, 26B9, 30D8, и 32G8) инкубировали в планшетах на 96 лунок вместе с равным количеством злокачественных клеток, экспрессирующих различные уровни EGFRvIII белка или EGFRwt белка. Совместные культуры поддерживали в конечном объеме 100 мкл X-Vivo™-15 среды (Lonza, Walkersville, MD) в течение 6 ч при 37°C с 5% CO₂. CD107a окрашивание осуществляли при стимуляции клеток, путем добавления флуоресцентного анти-CD107a антитела (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) в начале совместного культивирования, вместе с конечной концентрацией 1 мкг/мл анти-CD49d (BD Pharmingen, San Diego, CA), 1 мкг/мл анти-CD28 (Miltenyi Biotec), и 1x Monensin (eBioscience, San Diego, CA) раствора. После периода инкубирования 6 ч, клетки окрашивали с помощью восстановимого жизнеспособного красителя и конъюгированного с флуорохромом анти-CD8 антитела (Miltenyi Biotec) и анализировали путем проточной цитометрии. Дегранулирующую активность определяли в виде % жизнеспособных /CD8+/BFP+/CD107a+ клеток, и путем определения среднего сигнала интенсивности флуоресценции (MFI) для CD107a окрашивания для CD8+/BFP+ клеток. Исследования дегранулирования осуществляли в День 14 после CAR трансдукции. На фиг. 3 представлены результаты от двух РВМС доноров для каждого EGFRvIII специфического CAR. За исключением CAR T клеток, содержащих клоны C6 и 32G8, повышение дегранулирующей активности (больше CAR-T отдельно) наблюдали только в том случае, если EGFRvIII специфические CAR T клетки совместно культивировали с клеточными линиями, которые экспрессируют EGFRvIII, такими как NCI-H522-EGFRvIII и U87-KO-EGFRvIII.

Эти результаты свидетельствуют о том, что EGFRvIII специфические CAR T клетки проявляют дегранулирующую активность в присутствии EGFRvIII-экспрессирующих опухолевых клеток, но не проявляют дегранулирующую активность в присутствии опухолевых клеток, которые не экспрессируют EGFRvIII.

Пример 8. Секреция гамма-интерферона (IFN γ) EGFRvIII специфическими CAR T клетками.

В этом примере показано уровень IFN γ секреции EGFRvIII специфических CAR T клеток при совместном культивировании EGFRvIII специфических CAR T клеток с клеточными линиями, экспрессирующими целевой белок.

EGFRvIII специфические CAR T-клетки, экспрессирующие CAR, содержащие различные EGFRvIII специфические клоны (h62G7-L6/EQ, 14C11, 20B9, 32A10, 42G9, C6, 20E12, 26B9, 30D8, и 32G8) инкубировали в планшетах на 96 лунок (100 тыс. клеток/лунку), вместе с равным количеством клеток, экспрессирующих различные уровни EGFRvIII или EGFRwt белков (клетки NCI-H522, NCI-H522-EGFRvIII, U87-KO, U87-KO-EGFRwt, и U87-KO-EGFRvIII; каждая была описана выше в Примере 7). Совместные культуры поддерживали в конечном объеме 100 мкл X-Vivo™-15 среды (Lonza) в течение 18 ч при 37°C с 5% CO₂. После этого супернатант собирали и замораживали. IFN γ в супернатанте измеряли с помощью Human IFN-gamma Quantikine ELISA Kit (R&D systems, Minneapolis, MN) в соответствии со спецификацией производителя. Как показано на Фиг. 4, для большинства CAR T клеток, уровень секреции IFN γ коррелирует с количеством EGFRvIII, экспрессируемым совместно культивируемыми клетками: низкий экспрессор NCI-H522-EGFRvIII индуцирует небольшое количество IFN γ , высокий экспрессор U87-KO-EGFRvIII индуцирует большое количество IFN γ . T клетки, экспрессирующие EGFRvIII специфический клон 32G8 CAR, не секретируют существенные уровни IFN γ во всех тестируемых условиях. С другой стороны, T клетки EGFRvIII специфического клона C6 CAR, секретируют высокие уровни IFN γ при совместном культивировании либо с U87-KO-EGFRwt или U87-KO-EGFRvIII клетками.

Эти результаты свидетельствуют о том, что для большинства EGFRvIII специфических CAR T клеток, уровень секреции IFN γ коррелирует с количеством EGFRvIII, экспрессируемым совместно культивируемыми клетками

Пример 9. Цитотоксичность EGFRvIII специфических CAR T клеток.

В этом примере определяли цитотоксичность EGFRvIII специфических CAR T клеток при совместном культивировании EGFRvIII специфических CAR T клеток с клеточными линиями, экспрессирующими целевой белок.

EGFRvIII специфические CAR T-клетки, экспрессирующие CAR, содержащие различные EGFRvIII специфические клоны (h62G7-L6/EQ, 14C11, 20B9, 32A10, 42G9, C6, 20E12, 26B9, 30D8, и 32G8) высевали в планшетах на 96 лунок (400 тыс. клеток/лунку), совместно с 20 тыс. целевых клеток, экспрессирующих различные уровни EGFRvIII белка. Целевыми клетками были: U87-KO-EGFRwt, NCI-H522-EGFRvIII, и U87-KO-EGFRvIII, описанные выше. Целевые (EGFRvIII положительные: NCI-H522-EGFRvIII и U87-KO-EGFRvIII) и контрольные (EGFRvIII отрицательные: U87-KO-EGFRwt) клетки высевали на планшет и метили с помощью флуоресцентного внутриклеточного красителя CFSE перед их совместным культивированием с EGFRvIII специфическими CAR T-клетками. Сокультуры инкубировали в течение 4 ч при 37°C с 5% CO₂. После этого инкубационного периода, клетки метили с помощью восстановимого жизнеспособного красителя и анализировали путем проточной цитометрии. Определяли жизнеспособность каждой популяции клеток (EGFRvIII положительные целевые клетки или EGFRvIII отрицательные контрольные клетки) и рассчитывали % лизиса специфических клеток. Исследования цитотоксичности осуществляли через 14 дней после CAR трансдукции T клеток. Все EGFRvIII специфические CAR T клетки, за исключением 32G8, были способны лизировать как целевые экспрессирующие клетки с низким уровнем (NCI-H522-EGFRvIII), так и целевые экспрессирующие клетки с высоким (U87-KO-EGFRvIII) до различных степеней. Дополнительно, T клетки EGFRvIII специфического клона C6 CAR лизировали как EGFR дикого типа, так и EGFRvIII экспрессирующие клетки (фиг. 5).

Эти результаты свидетельствуют о том, что EGFRvIII-специфические CAR T клетки эффективно убивают клетки, которые экспрессируют EGFRvIII.

Пример 10. Исследования *in vivo* EGFRvIII специфических CAR T клеток на модели U87-KO-EGFRvIII.

В этом примере показана противоопухолевая активность EGFRvIII специфических CAR T клеток на подкожной U87-KO-EGFRvIII GBM модели ксенотрансплантата.

Три миллиона U87-KO-EGFRvIII GBM опухолевых клеток (описанных выше) имплантировали подкожно NSG мышам в возрасте 5-6 недель (Jackson Laboratory, Sacramento, CA). Объем опухоли измеряли один раз в неделю с помощью штангенциркуля и рассчитывали согласно следующей формуле:

$$\text{Объем опухоли} = (\text{длина} \times \text{ширина}^2) / 2.$$

В день 8 после имплантации опухоли, животных рандомизировали согласно размерам опухоли по пять животных на группу и вводили однократную дозу 6 миллионов CAR положительных EGFRvIII специфических CAR T клеток (экспрессирующих EGFRvIII специфический клон 14C11, 32A10 или 26B9; клоны описаны в другом месте в настоящем изобретении) или эквивалентное общее количество нетрансдуцированных T клеток путем болюсной инъекции в хвостовую вену. На фиг. 6 показано, что 14C11, 32A10 и 26B9 EGFRvIII специфические CAR T клетки, но не нетрансдуцированные T клетки, ингибируют рост U87-KO-EGFRvIII опухолевого ксенотрансплантата *in vivo*.

Эти результаты свидетельствуют о том, что EGFRvIII-специфические CAR T клетки эффективно ингибируют рост опухоли EGFRvIII-экспрессирующих клеток *in vivo*.

Пример 11. Поверхностная экспрессия EGFRvIII специфических CAR, содержащих R2 суицидную последовательность.

В этом примере показана экспрессия EGFRvIII специфических CAR, содержащих R2 суицидную последовательность в T клетках.

R2 суицидная последовательность представляет собой суицидную последовательность на основании CD20 эпитопа и содержит две тандемные копии эпитопа распознавания ритуксимаба. R2 последовательность инсертировали между последовательностями scFv и CD8 α петли различных EGFRvIII специфических CAR, описанных в другом месте в настоящем изобретении (14C11, 32A10, 30D8, и 26B9) для создания различных EGFRvIII-R2 CAR (обозначаемых в настоящем изобретении как "14C11-R2", "32A10-R2", "30D8-R2", и "26B9-R2", соответственно). T клетки трансдуцировали с помощью лентивирусного вектора, который заякоривает различные EGFRvIII-R2 CAR экспрессионные кассеты под контролем EF1 α промотора при множественности заражения (MOI) 5 или 25 (для клонов 26B9-R2 и 30D8-R2). CAR T клетки поддерживали в культуре вплоть до 14 или 15 дней после трансдукции. CAR экспрессию мониторили в динамике (в День 4, День 9/10, и День 14/15 после трансдукции T-клеток) путем проточной цитометрии, используя биотинилированные рекомбинатные белки: EGFRvIII-mFc или ритуксимаб к клеткам (конъюгированным с EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin; ThermoFisher, Waltham, MA), затем с помощью PE конъюгированного стрептовида (BD Biosciences, San Diego, CA). Процентные значения CAR положительных клеток, как обнаружено с биотинилированным EGFRvIII-mFc и биотинилирован-

ным ритуксимабом, представлены на фиг. 7 и 8, соответственно. Связывание с нетрансдуцированными Т клетками (NTD) использовали в качестве контроля.

Эти результаты демонстрируют экспрессию в Т клетках EGFRvIII-специфических CAR, содержащих R2 суицидную последовательность.

Пример 12. Цитотоксичность EGFRvIII-специфических R2 CAR Т клеток.

В этом примере показана цитотоксичность EGFRvIII-специфических R2 CAR Т клеток при совместном культивировании с целевыми экспрессирующими клеточными линиями.

Анализ цитотоксичности осуществляли, как описано в примере 9, используя EGFRvIII-R2 CAR 14C11-R2, 32A10-R2, 30D8-R2, и 26B9-R2, которые описаны в примере 11. Все тестируемые EGFRvIII специфические R2 CAR Т клетки были способны лизировать как целевые экспрессирующие клетки с низким уровнем (NCI-H522-EGFRvIII), так и целевые экспрессирующие клетки с высоким уровнем (U87-KO-EGFRvIII) до различных степеней (фиг. 9).

Эти результаты свидетельствуют о том, что EGFRvIII-специфические R2 CAR Т клетки эффективно убивают клетки, которые экспрессируют EGFRvIII.

Несмотря на то, что описанные принципы были описаны со ссылкой на различные применения, способы, наборы и композиции, следует принять во внимание, что могут быть осуществлены различные изменения и модификации без отклонения от принципов, раскрытых в настоящем изобретении и изобретении, заявляемом ниже. Вышеприведенные примеры представлены для лучшей иллюстрации раскрытых принципов и не предназначены для ограничения объема принципов, представленных в настоящем изобретении. Хотя принципы данного изобретения были описаны в контексте этих типичных вариантов осуществления, квалифицированный специалист в данной области техники легко будет понимать, что возможны различные вариации и модификации этих типичных вариантов осуществления без чрезмерных экспериментов. Все такие вариации и модификации охватываются объемом заявляемого изобретения.

Все ссылки, процитированные в настоящем изобретении, включая патенты, патентные заявки, документы, пособия и др., и ссылки, процитированы в этих источниках, до такой степени, что они полностью включены в настоящую заявку в качестве ссылки. В случае, если один или несколько включенных источников и сходных материалов отличаются от или противоречат настоящей заявке, включая, но не ограничиваясь только ими, определяемые термины, используемые термины, описанные техники или другие, то используются термины настоящей заявки.

Вышеприведенное описание и примеры подробно описывают определенные специфические варианты осуществления изобретения и описывают наилучший вариант, предполагаемый изобретателями. Тем не менее, следует принять во внимание, что, независимо от того, насколько подробно вышеприведенное может появляться в описании, изобретение может практически осуществляться различными путями и изобретение следует интерпретировать в соответствии с пунктами приложенной формулы изобретения и любыми их эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), специфический к варианту III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), содержащий EGFRvIII-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где EGFRvIII-связывающий домен содержит:

(а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую три определяющие комплементарность области: определяющую комплементарность область 1 VH (VH CDR1), определяющую комплементарность область 2 VH (VH CDR2) и определяющую комплементарность область 3 VH (VH CDR3) из 42G9, расположенные последовательно от N-конца до C-конца VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, где VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 74-76, VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 77-78 и VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую три определяющие комплементарность области: определяющую комплементарность область 1 VL (VL CDR1), определяющую комплементарность область 2 VL (VL CDR2) и определяющую комплементарность область 3 VL (VL CDR3) из 42G9, расположенные последовательно от N-конца до C-конца VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, где VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156, VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157 и VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158; или

(b) область VH, содержащую три определяющие комплементарность области VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из 32A10, расположенные последовательно от N-конца до C-конца VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, где VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 80-82, VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 83-84 и VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; и

область VL, содержащую три определяющие комплементарность области VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из 32A10, расположенные последовательно от N-конца до C-конца VL CDR1, VL CDR2 и VL

тельность SEQ ID NO: 197; и

(i) область VH, содержащую три определяющие комплементарности области VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 из 12B2, расположенные последовательно от N-конца до C-конца VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, где VH CDR1 содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 74-76, VH CDR2 содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 102 или 103 и VH CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; и

область VL, содержащую три определяющие комплементарности области VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из 12B2, расположенные последовательно от N-конца до C-конца VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, где VL CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176, VL CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 172 и VL CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 177.

2. Химерный антигенный рецептор (CAR), специфический к варианту III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII) и содержащий EGFRvIII-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где EGFRvIII-связывающий домен содержит одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), содержащий область VH и область VL, выбранные из группы, состоящей из:

i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (42G9);

ii) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (32A10);

iii) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 (20B9);

iv) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 (14C11);

v) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 (30D8);

vi) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 (20E12);

vii) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 (26B9); и

viii) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (C6); и

ix) область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 (12B2).

3. Химерный антигенный рецептор (CAR), специфический к варианту III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII) и содержащий EGFRvIII-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где EGFRvIII-специфический химерный антигенный рецептор (CAR) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53-57 и 59-61.

4. EGFRvIII-специфический CAR по одному из пп.1-3, где внутриклеточный сигнальный домен представляет собой первый внутриклеточный сигнальный домен и необязательно CAR дополнительно содержит второй внутриклеточный сигнальный домен.

5. EGFRvIII-специфический CAR по п.4, где первый внутриклеточный сигнальный домен содержит CD3зета сигнальный домен и необязательный второй внутриклеточный сигнальный домен содержит 4-1BB сигнальный домен.

6. EGFRvIII-специфический CAR по одному из пп.1-5, дополнительно содержащий стеблевой домен между внеклеточным связывающим лиганд доменом и первым трансмембранным доменом.

7. EGFRvIII-специфический CAR по п.6, где стеблевой домен выбран из группы, состоящей из: человеческого CD8 α шарнира, человеческого CD28 шарнира, IgG1 шарнира и Fc γ RIII α шарнира.

8. EGFRvIII-специфический CAR по одному из пп.1-7, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен цепи CD8 α .

9. Выделенный полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую EGFRvIII-специфический CAR по одному из пп.1 и 4-8.

10. Выделенный полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую EGFRvIII-специфический CAR по одному из пп.2 и 4-8.

11. Выделенный полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую EGFRvIII-специфический CAR по одному из пп.3-8.

12. Выделенный вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по одному из пп.9-11.

13. Выделенная сконструированная иммунная клетка гемопоэтического происхождения для лечения рака, содержащая полинуклеотид по одному из пп.9-11, или вектор экспрессии по п.12, где указанная иммунная клетка экспрессирует на своей клеточной поверхностной мембране EGFRvIII-специфический CAR по одному из пп.1-8, при этом иммунная клетка представляет собой воспалитель-

ный Т-лимфоцит, цитотоксический Т-лимфоцит, Т-лимфоцит памяти, хелперный Т-лимфоцит, природный киллерный Т-лимфоцит или естественную киллерную клетку.

14. Выделенная сконструированная иммунная клетка по п.13, где иммунную клетку получают от здорового донора или от пациента.

15. Выделенная сконструированная иммунная клетка по п.13 или 14, где выделенная иммунная клетка представляет собой цитотоксичный Т-лимфоцит, Т-лимфоцит памяти, хелперный Т-лимфоцит и естественную киллерную клетку.

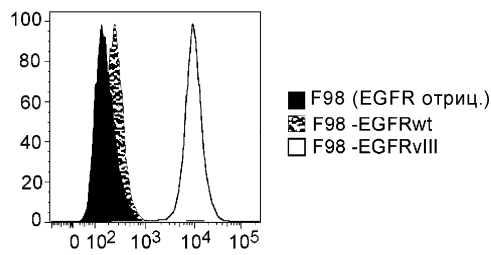
16. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая эффективное количество выделенной сконструированной иммунной клетки по одному из пп.13-15.

17. Применение выделенной сконструированной иммунной клетки по одному из пп.13-15 для получения лекарственного средства для лечения рака.

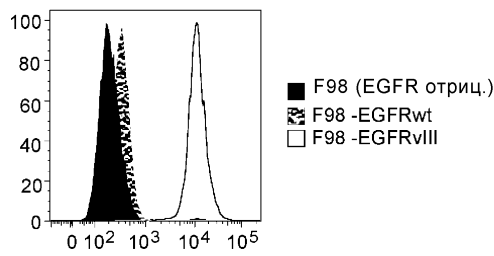
18. Способ конструирования иммунной клетки, включающий:

a) обеспечение иммунной клетки; и

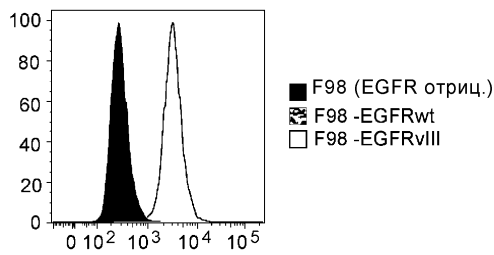
b) экспрессирование на поверхности клетки по меньшей мере одного EGFRvIII-специфического CAR по одному из пп.1-8.



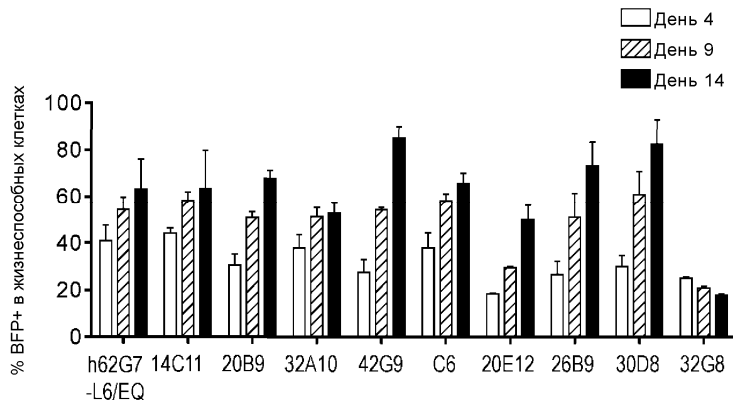
Фиг. 1А



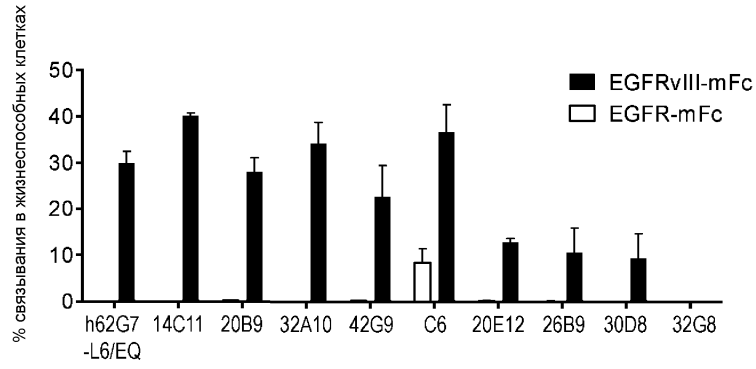
Фиг. 1В



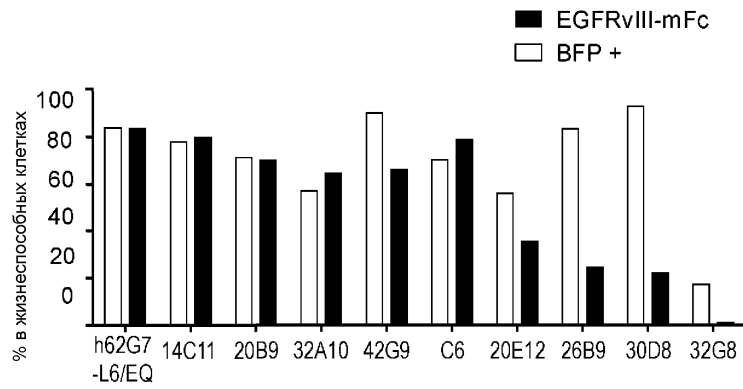
Фиг. 1С



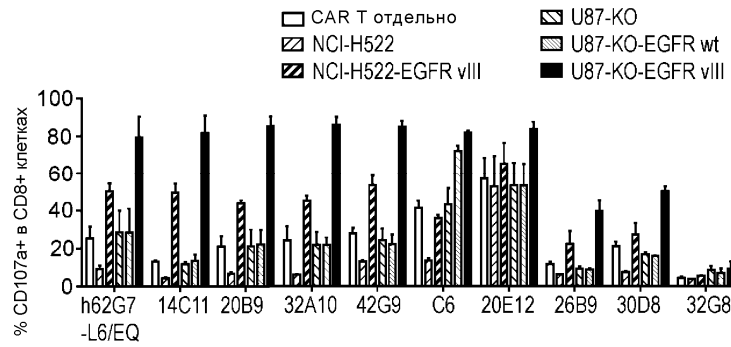
Фиг. 2А



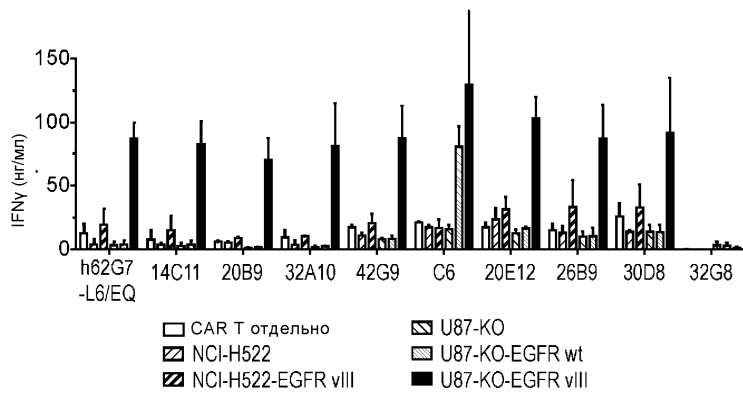
Фиг. 2В



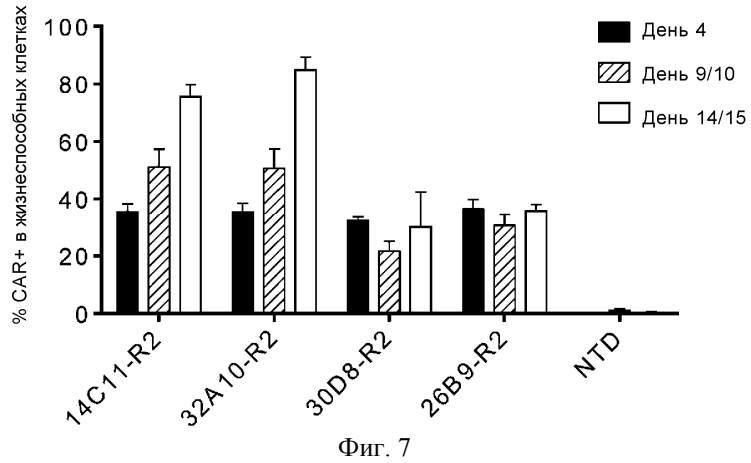
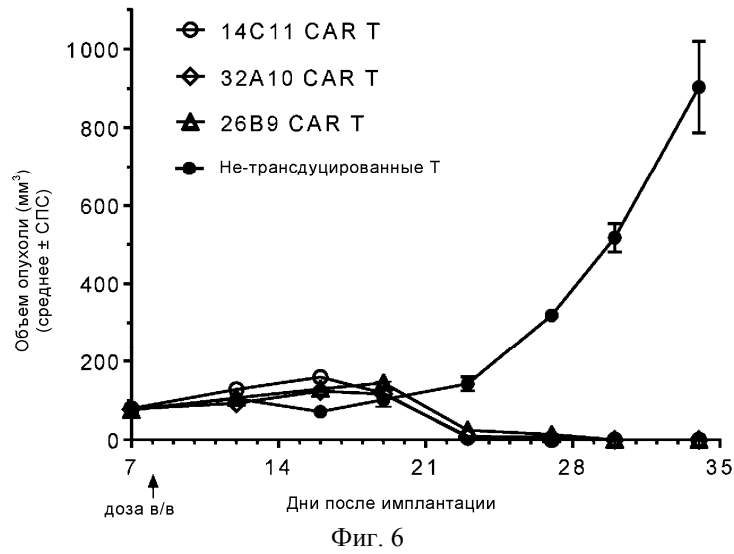
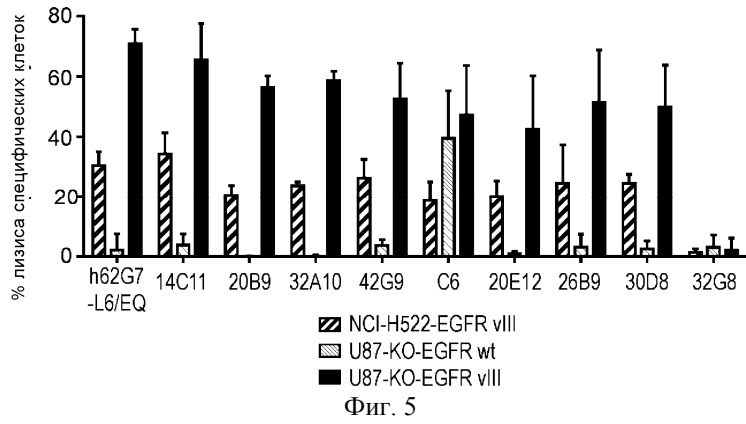
Фиг. 2С

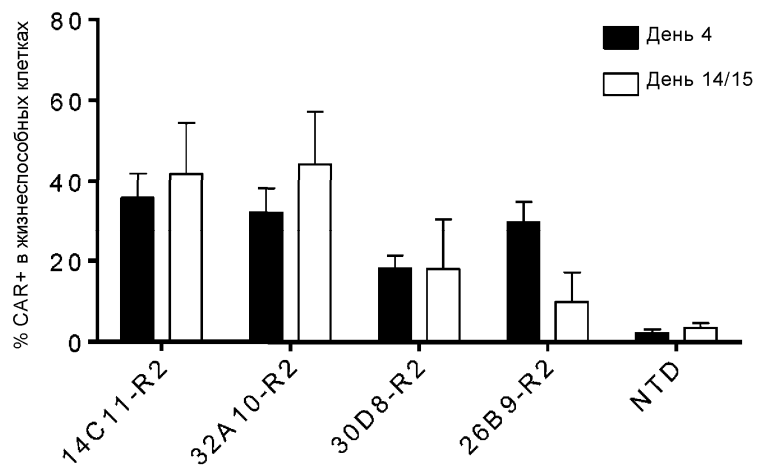


Фиг. 3

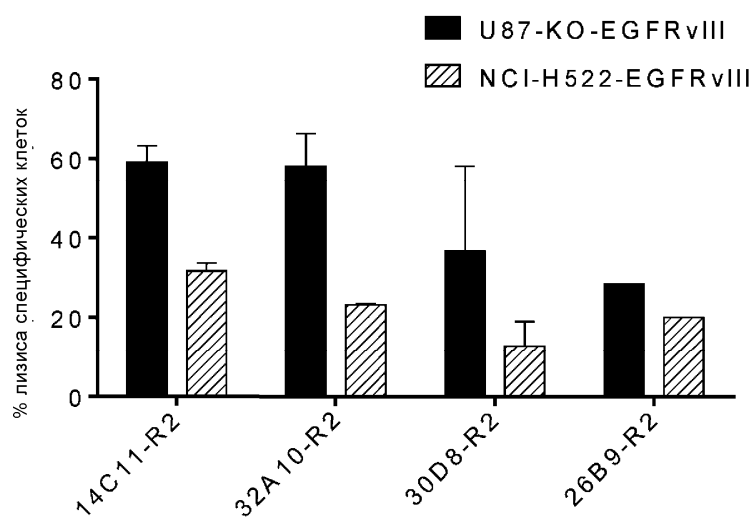


Фиг. 4





Фиг. 8



Фиг. 9