

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047424**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.19

(21) Номер заявки
202092417

(22) Дата подачи заявки
2019.04.10

(51) Int. Cl. **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) **ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К DLL3 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/655,725**

(32) **2018.04.10**

(33) **US**

(43) **2021.01.26**

(86) **PCT/US2019/026840**

(87) **WO 2019/200007 2019.10.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АМГЕН ИНК.; КАЙТ ФАРМА, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Гиффин Майкл Джон, Томас Мелисса,
Муравски Кристофер, Кейс Райан
Бенджамин, Ву Лоурен, Уилциус
Джед, Родригез Рубен Альварез, Фэн
Цзюнь (US)**

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

(56) **WO-A1-2016138038**

WO-A1-2017021349

L. R. SAUNDERS ET AL.: "A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 7, no. 302, 26 August 2015 (2015-08-26), pages 1-15, XP055288294, US ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aac9459, the whole document

M Giffin ET AL.: "Targeting DLL3 with AMG 757, a BiTE Antibody Construct, and AMG 119, a CAR-T, for the Treatment of SCLC", 1 October 2018 (2018-10-01), XP055595525, Retrieved from the Internet: URL:https://www.jto.org/article/S1556-0864(18)32784-9/pdf [retrieved on 2019-06-11], the whole document

Lauren Averett Byers: "Phase 1 study of AMG 119, a chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy targeting DLL3, in patients with relapsed/refractory small cell lung cancer (SCLC)", 26 May 2019 (2019-05-26), XP055595604, Retrieved from the Internet: URL:https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.TPS8576?af=R [retrieved on 2019-06-11], the whole document

(57) В соответствии с настоящим изобретением раскрыты антигенсвязывающие молекулы, химерные рецепторы и сконструированные иммунные клетки, связывающиеся с DLL3. Настоящее изобретение также относится к векторам, композициям и способам лечения и/или выявления с использованием антигенсвязывающих молекул и сконструированных иммунных клеток, связывающих DLL3.

B1

047424

**047424
B1**

Испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/655725, поданной 10 апреля 2018 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки в полном его объеме. Указанная копия ASCII, созданная 10 апреля 2019 года, называется A-2249-WO-PCT_SL.txt и имеет размер 86327 байт.

Предпосылки изобретения

На мелкоклеточный рак легкого (SCLC) приходится где-то 15% всех диагностированных случаев рака легкого, однако он является агрессивной формой легочной карциномы (Enstone et al. (2017) *Pharmacoecson Open* doi: 10.1007/s41669-017-0045-0; Bunnet al. (2016) *J Thorac Oncol*; 11:453-74; Siegel et al. (2016) *CA Cancer J Clin*; 66:7-30). Дельта-подобный лиганд 3 (DLL3) является представителем семейства лигандов дельта/Serrate/Lag-2 рецептора Notch и, как полагают, играет роль в передаче сигналов Notch. DLL3 является ингибирующим лигандом сигнального пути Notch и обычно экспрессируется исключительно на внутриклеточных мембранах (Geffers et al. (2007) *J Cell Biol*; 178:465-76.). Репрезентативные ортологи белка DLL3 включают без ограничения ортологи человека (номера доступа NP_058637 и NP_982353), шимпанзе (номер доступа XP_003316395), мыши (номер доступа NP_031892) и крысы (номер доступа NP_446118). У людей ген DLL3 состоит из 8 экзонов размером 9,5 т.п.о., расположенных на хромосоме 19q13. Результатом альтернативного сплайсинга последнего экзона являются два подвергнутых процессингу транскрипта, один размером 2389 оснований (номер доступа NM_016941) и один размером 2052 основания (номер доступа NM_203486). Первый транскрипт кодирует белок из 618 аминокислот (номер доступа NP_058637; SEQ ID NO: 29), тогда как второй кодирует белок из 587 аминокислот (номер доступа NP_982353; SEQ ID NO: 30). Было обнаружено, что в определенных формах рака, например SCLC, DLL3 экспрессируется на клеточной поверхности, что делает его чрезвычайно избирательным в отношении опухолей белком клеточной поверхности (Saunders et al. (2015) *Sci Transl Med*; 7:302ra136.).

Было показано, что сконструированные клетки иммунной системы обладают требуемыми качествами в терапевтическом лечении, в частности в онкологии. Два основных типа сконструированных клеток иммунной системы представляют собой клетки, которые содержат химерные антигенные рецепторы (называемые "CAR" или "CAR-T") и T-клеточные рецепторы ("TCR"). Такие сконструированные клетки сконструированы для придания им специфичности в отношении антигена при сохранении или усилении их способности к распознаванию и уничтожению клетки-мишени. Химерные антигенные рецепторы могут содержать, например, (i) антигенспецифический компонент ("антигенсвязывающую молекулу"), (ii) один или несколько костимулирующих доменов и (iii) один или несколько активирующих доменов. Каждый домен может быть гетерогенным, т. е. состоящим из последовательностей, полученных из разных белковых цепей. Клетки иммунной системы, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (такие как T-клетки), можно использовать в различных видах терапии, включая виды терапии рака. Следует понимать, что костимулирующие полипептиды, определенные в данном документе, можно применять для усиления активации CAR-экспрессирующих клеток против антигенов-мишеней, а следовательно повышения эффективности адаптивной иммунотерапии.

T-клетки можно конструировать таким образом, чтобы они обладали специфичностью в отношении одной или нескольких требуемых мишеней. Например, T-клетки можно трансдуцировать с помощью ДНК или другого генетического материала, кодирующего антигенсвязывающую молекулу, такую как один или несколько одноцепочечных варибельных фрагментов ("scFv") антитела в сочетании с одной или несколькими сигнальными молекулами и/или одним или несколькими активирующими доменами, такими как CD3-дзета.

Помимо способности CAR-T-клеток распознавать и уничтожать клетки-мишени, успешная T-клеточная терапия извлекает пользу от способности CAR-T-клеток персистировать и сохранять способность к пролиферации в ответ на антиген.

Существует потребность в определении новых и улучшенных видов терапии заболеваний и нарушений, связанных с DLL3.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к сконструированным иммунным клеткам (таким как CAR или TCR), антигенсвязывающим молекулам (включая без ограничения антитела, scFv, тяжелые и/или легкие цепи и CDR этих антигенсвязывающих молекул) со специфичностью в отношении DLL3.

Химерные антигенные рецепторы по настоящему изобретению, как правило, содержат: (i) DLL3-специфическую антигенсвязывающую молекулу, (ii) один или несколько костимулирующих доменов и (iii) один или несколько активирующих доменов. Следует понимать, что каждый домен может быть гетерогенным и, таким образом, состоять из последовательностей, полученных из разных белковых цепей.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору, содержащему антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с DLL3, где антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере одну из: (a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, отличающуюся от последова-

тельности под SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 52, или SEQ ID NO: 62 не более чем 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности под SEQ ID NO: 43, или SEQ ID NO: 53, или SEQ ID NO: 63 не более чем 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности под SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 64 не более чем 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности под SEQ ID NO: 47, или SEQ ID NO: 57, или SEQ ID NO: 67 не более чем 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности под SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 58, или SEQ ID NO: 68 не более чем 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков; (f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности под SEQ ID: 49, или SEQ ID NO: 59, или SEQ ID NO: 69 не более чем 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков.

В других вариантах осуществления химерный антигенный рецептор дополнительно содержит по меньшей мере один костимулирующий домен. В дополнительных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор дополнительно содержит по меньшей мере один активирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен представляет собой сигнальную область из CD28, CD28T, CD8, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1), индуцируемого Т-клеточного костимулятора (ICOS), функционально-ассоциированного антигена 1 лимфоцитов (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig-альфа (CD79a), DAP-10, Fc-гамма-рецептора, молекулы МНС класса I, TNF-рецепторных белков, белка иммуноглобулина, рецептора цитокина, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL-2R-бета, IL-2R-гамма, IL-7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфически связывается с CD83, или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен получен из 4-1BB. В других вариантах осуществления костимулирующий домен получен из CD28 или CD28T. В других вариантах осуществления костимулирующий домен получен из CD8.

В других вариантах осуществления костимулирующий домен получен из OX40. См. также Hombach et al, *Oncoimmunology*. 2012 Jul. 1; 1(4): 458-466. В еще одних вариантах осуществления костимулирующий домен содержит ICOS, как описано у Guedan et al, August 14, 2014; *Blood*: 124 (7) и Shen et al, *Journal of Hematology & Oncology* (2013) 6:33. В еще одних вариантах осуществления костимулирующий домен содержит CD27, как описано у Song et al, *Oncoimmunology*. 2012 Jul. 1; 1(4): 547-549.

В определенных вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 содержит SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8. В дополнительных вариантах осуществления костимулирующий домен CD8 содержит SEQ ID NO: 14. В дополнительных вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB содержит SEQ ID NO: 16. В дополнительных вариантах осуществления активирующий домен содержит CD3, CD3-дзета или CD3-дзета, имеющий последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору, где костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 2, и активирующий домен содержит SEQ ID NO: 10.

Настоящее изобретение дополнительно относится к полинуклеотидам, кодирующим химерные антигенные рецепторы, и векторам, содержащим полинуклеотиды. Вектор может представлять собой, например, ретровирусный вектор, ДНК-вектор, плазмиду, РНК-вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса, лентивирусный вектор или любую их комбинацию. Настоящее изобретение дополнительно относится к клеткам иммунной системы, содержащим векторы. В некоторых вариантах осуществления лентивирусный вектор представляет собой вектор рGAR.

Иллюстративные клетки иммунной системы включают без ограничения Т-клетки, лимфоциты, инфилтрирующие опухоль (TIL), NK-клетки, TCR-экспрессирующие клетки, дендритные клетки или NK-Т-клетки. Т-клетки могут являться аутологичными, аллогенными или гетерологичными. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим описанные в данном документе иммунные клетки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим

молекулам (и химерным антигенным рецепторам, содержащим эти молекулы), содержащим по меньшей мере одну из:

(а) VH-области, отличающейся от аминокислотной последовательности VH-области 1H2.1 не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков, и VL-область, отличающуюся от аминокислотной последовательности VL-области 1H2.1 не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков;

(b) VH-области, отличающейся от аминокислотной последовательности VH-области 8D2 не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков, и VL-область, отличающуюся от аминокислотной последовательности VL-области 8D2 не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков;

(с) VH-области, отличающейся от аминокислотной последовательности VH-области 6B2 не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков, и VL-область, отличающуюся от аминокислотной последовательности VL-области 6B2 не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислотных остатков;

и где или VH- и VL-область или области связаны по меньшей мере одним линкером.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам (и химерным антигенным рецепторам, содержащим эти молекулы), где линкер предусматривает по меньшей мере один из scFv-линкера G4S и scFv-линкера Whitlow.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к векторам, кодирующим полипептиды по настоящему изобретению, и к иммунным клеткам, содержащим эти полипептиды. Предпочтительные клетки иммунной системы включают Т-клетки, лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), NK-клетки, TCR-экспрессирующие клетки, дендритные клетки или NK-Т-клетки. Т-клетки могут являться аутологичными, аллогенными или гетерологичными.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащие антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с DLL3, где антигенсвязывающая молекула содержит CDR3 вариательной области тяжелой цепи (Yн), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 44, или SEQ ID NO: 54, или SEQ ID NO: 64. Полинуклеотиды могут дополнительно содержать активирующий домен. В предпочтительных вариантах осуществления активирующий домен представляет собой CD3, более предпочтительно CD3-дзета, более предпочтительно аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение включает костимулирующий домен, такой как CD28, CD28T, OX40, CD8, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированный антиген-1 лимфоцитов (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член суперсемейства факторов некроза опухоли 14; TNFSF14), NKG2C, Ig-альфа (CD79a), DAP-10, Fc-гамма-рецептор, молекула MHC класса I, TNF, TNFr, интегрин, сигнальную молекулу активации лимфоцитов, BTLA, рецептор лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL-2R-бета, IL-2R-гамма, IL-7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1-1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1-1a, LFA-1, ITGAM, CD1-1b, ITGAX, CD1-1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд CD83 или их фрагменты или комбинации. Предпочтительные костимулирующие домены перечислены ниже.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), где указанный CAR или TCR содержит антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с DLL3, и где антигенсвязывающая молекула содержит CDR3 вариательной области тяжелой цепи (V₁), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 67. Полинуклеотид может дополнительно содержать активирующий домен. Полинуклеотид может дополнительно содержать костимулирующий домен.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащие антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с DLL3, где тяжелая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 42), CDR2 (SEQ ID NO: 43) и CDR3 (SEQ ID NO: 44), и легкая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 47), CDR2 (SEQ ID NO: 48) и CDR3 (SEQ ID NO: 49).

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержа-

щие антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с DLL3, где тяжелая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 52), CDR2 (SEQ ID NO: 53) и CDR3 (SEQ ID NO: 54), и легкая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 57), CDR2 (SEQ ID NO: 58) и CDR3 (SEQ ID NO: 59).

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), содержащие антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с DLL3, где тяжелая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 62), CDR2 (SEQ ID NO: 63) и CDR3 (SEQ ID NO: 64), и легкая цепь антигенсвязывающей молекулы содержит CDR1 (SEQ ID NO: 67), CDR2 (SEQ ID NO: 68) и CDR3 (SEQ ID NO: 69).

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающимся с DLL3 молекулам, содержащим по меньшей мере одну последовательность CDR3 варибельной области тяжелой цепи или CDR3 варибельной области легкой цепи, как изложено в данном документе. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающимся с DLL3 молекулам, содержащим по меньшей мере одну последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, как описано в данном документе. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающимся с DLL3 молекулам, содержащим по меньшей мере одну последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи, как описано в данном документе. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающимся с DLL3 молекулам, содержащим как последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, так и последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи, как описано в данном документе.

Дополнительные варибельные домены тяжелой и легкой цепей, полинуклеотидные и аминокислотные последовательности CDR, подходящие для использования в DLL3-связывающих молекулах в соответствии с настоящим изобретением, можно найти в предварительной заявке на патент США № 62/199944, поданной 31 июля 2015 года.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающим введение субъекту антигенсвязывающих молекул, CAR, TCR, полинуклеотидов, векторов, клеток или композиций в соответствии с настоящим изобретением. Подходящие для лечения заболевания включают без ограничения опухоли надпочечника, печени, почки, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, яичника, шейки матки, матки, пищевода, колоректальный рак, рак предстательной железы (например, аденокарциному предстательной железы), поджелудочной железы, легкого (как мелкоклеточный, так и немелкоклеточный), щитовидной железы, виды карциномы, саркомы, глиобластомы, опухоли головы и шеи, крупноклеточную нейроэндокринную карциному (LCNEC), медуллярный рак щитовидной железы, глиобластому, нейроэндокринный рак предстательной железы (NEPC), высокозлокачественный рак желудочно-кишечного тракта или поджелудочной железы (GEP) и злокачественную меланому.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображена экспрессия CAR к DLL3 в Т-клетках здорового донора.

На фиг. 2 изображена цитолитическая активность трансдуцированных лентивирусом Т-клеток с CAR от здорового донора.

На фиг. 3 изображено продуцирование цитокинов Т-клетками с CAR от здорового донора.

На фиг. 4 изображен анализ пролиферации Т-клеток с помощью проточной цитометрии в ответ на DLL3-экспрессирующие клетки-мишени.

На фиг. 5 изображена противоопухолевая активность *in vivo* Т-клеток с CAR к DLL3 в мышинной ксеногенной модели SCLC человека.

На фиг. 6 изображен анализ выживаемости мышинной ксеногенной модели SCLC после обработки Т-клетками с CAR к DLL3.

На фиг. 7 изображена карта вектора pGAR.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что химерные антигенные рецепторы (CAR или CAR-T) и Т-клеточные рецепторы (TCR) являются рецепторами, созданными с помощью генной инженерии. Эти сконструированные рецепторы могут легко вставляться и экспрессироваться иммунными клетками, включая Т-клетки, в соответствии с методиками, известными из уровня техники. С CAR один рецептор может быть запрограммирован как на распознавание специфического антигена, так и, в случае связывания с этим антигеном, на активацию иммунной клетки для атаки и уничтожения клетки, несущей этот антиген. Когда эти антигены существуют на опухолевых клетках, иммунная клетка, которая экспрессирует CAR, может нацеливаться и уничтожать опухолевую клетку.

CAR можно сконструировать так, чтобы они связывались с антигеном (например, с антигеном на клеточной поверхности), путем встраивания антигенсвязывающей молекулы, которая будет взаимодействовать с этим целевым антигеном. Предпочтительно, антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или его фрагмент, и более предпочтительно один или несколько фрагментов одноцепочечного антитела ("scFv"). ScFv представляет собой фрагмент одноцепочечного антитела, содержащий ва-

риабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, связанные вместе. См. патенты США №№ 7741465 и 6319494, а также Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136. ScFv сохраняет способность исходного антитела специфически взаимодействовать с целевым антигеном. scFv являются предпочтительными для использования в химерных антигенных рецепторах, потому что они могут быть сконструированы так, чтобы экспрессироваться как часть одной цепи вместе с другими компонентами CAR. Id. См. также Krause et al, *J. Exp. Med.*, Volume 188, No. 4, 1998 (619-626); Finney et al, *Journal of Immunology*, 1998, 161: 2791-2797. Будет понятно, что антигенсвязывающая молекула, как правило, содержится во внеклеточной части CAR, так что она способна распознавать представляющий интерес антиген и связываться с ним. Биспецифические и мультиспецифические CAR находятся в пределах объема настоящего изобретения со специфичностью более чем к одной представляющей интерес мишени.

Костимулирующие домены. Химерные антигенные рецепторы могут включать костимулирующие (сигнальные) домены для повышения их активности. См. патенты США №№ 7741465 и 6319494, а также Krause et al. и Finney et al. (выше), Song et al, *Blood* 119:696-706 (2012); Kalos et al, *Sci Transl. Med.* 3:95 (2011); Porter et al, *N. Engl. J. Med.* 365:725-33 (2011) и Gross et al, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56:59-83 (2016). Например, CD28 представляет собой костимулирующий белок, который в природе встречается в Т-клетках. Полная нативная аминокислотная последовательность CD28 описана в иллюстративной последовательности NCBI: NP006130.1. Полная нативная последовательность нуклеиновой кислоты CD28 описана в иллюстративной последовательности NCBI: NM_006139.1.

Определенные домены CD28 используются в химерных антигенных рецепторах. В соответствии с настоящим изобретением на сегодняшний день было обнаружено, что новый внеклеточный домен CD28, названный "CD28T", неожиданно обеспечивает определенные преимущества при использовании в конструкции CAR.

Нуклеотидная последовательность молекулы CD28T, включая внеклеточный домен CD28T, трансмембранный и внутриклеточный домены CD28, представлена под SEQ ID NO: 1:

```
CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCA
CCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCG
TAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATC
TTCTGGGTAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGA
CTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAG
AGATTCGCTGCCTATCGGAGC
```

Соответствующая аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 2:

```
LDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGLACYSLLVTVAFII
FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
```

Нуклеотидная последовательность внеклеточной части CD28T представлена под SEQ ID NO: 3:

```
CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCA
CCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA
```

Соответствующая аминокислотная последовательность внеклеточного домена CD28T представлена под SEQ ID NO: 4:

```
LDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFPGPSKPF
```

Нуклеотидная последовательность трансмембранного домена CD28 представлена под SEQ ID NO: 5):

```
TTCTGGGTGTTGGTCGTAAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCG
TCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT
```

Аминокислотная последовательность трансмембранного домена CD28 представлена под SEQ ID NO: 6:

```
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
```

Нуклеотидная последовательность внутриклеточного сигнального домена CD28 представлена под SEQ ID NO: 7:

```
AGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCC
ACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT
TTCGCTGCCTATCGGAGC
```

Аминокислотная последовательность внутриклеточного сигнального домена CD28 представлена под SEQ ID NO: 8:

```
RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
```

Дополнительные последовательности CD28, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают нуклеотидную последовательность CD28, представленную под SEQ ID NO: 11:

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGG
TACCATCATTCACGTGAAAGGTAACACCTGTGTCTTCTCCCCCTTCCCCGGGC
CATCAAAGCCC

Соответствующая аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 12:

IEVMYPPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP

Другие подходящие внеклеточные или трансмембранные последовательности могут быть получены из CD8. Нуклеотидная последовательность подходящего внеклеточного и трансмембранного домена CD8 представлена под SEQ ID NO: 13:

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTG
TTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCAGCTCC
TACCATCGTTTACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGCA
GGGGGCGCTGTTTCATACCAGAGGACTGGATTCGCTGCGATATCTATATCTGGG
CACCCCTGGCCGGAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTAT
TGTAATCACAGGAAC

Соответствующая аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 14:

AAALSNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN

Другие подходящие внутриклеточные сигнальные последовательности могут быть получены из 41-BB. Нуклеотидная последовательность подходящего внутриклеточного сигнального домена 41-BB представлена под SEQ ID NO: 15:

CGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGAGAAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAA
CAGCCGTTTATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCC
GCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTCCGAAGT

Соответствующая аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 16:

RFSVVKRGRKLLYIFKQPMRPVQTTEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

Подходящие костимулирующие домены в пределах объема настоящего изобретения могут быть получены, помимо других источников, из CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD 33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированного антигена-1 лимфоцитов (LFA-1 (CD1 1a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член суперсемейства факторов некроза опухолей 14; TNFSF14), NKG2C, Ig-альфа (CD79a), DAP-10, Fc-гамма-рецептора, молекулы MHC класса I, TNF, TNF α , интегрин, сигнальной молекулы активации лимфоцитов, BTLA, рецептора лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL-2R-бета, IL-2R-гамма, IL-7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1-1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1-1a, LFA-1, ITGAM, CD1-1b, ITGAX, CD1-1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда CD83 или их фрагментов или комбинаций.

Активирующие домены.

CD3 является элементом T-клеточного рецептора на нативных T-клетках, и было показано, что он является важным внутриклеточным активирующим элементом в CAR. В предпочтительном варианте осуществления CD3 представляет собой CD3-дзета, нуклеотидная последовательность которого представлена под SEQ ID NO: 9:

AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCA
GAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTT
GGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAA
ACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCT
ATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGT
TTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGC
AAGCCCTGCCACCTAGG

Соответствующая аминокислота внутриклеточного CD3-дзета представлена под SEQ ID NO: 10:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRR
 KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM
 QALPPR

Ориентация доменов

Следует понимать, что структурно эти домены соответствуют положениям относительно иммунной клетки. Таким образом, эти домены могут быть частью (i) "шарнирного" или внеклеточного (EC) домена, (ii) трансмембранного (TM) домена и/или (iii) внутриклеточного (цитоплазматического) домена (IC). Внутриклеточный компонент часто частично содержит член семейства CD3, предпочтительно CD3-дзета, который способен активировать Т-клетку при связывании антигенсвязывающей молекулы с ее мишенью. В одном варианте осуществления шарнирный домен, как правило, состоит из по меньшей мере одного костимулирующего домена, как определено в данном документе.

Следует также понимать, что шарнирная область может также содержать несколько или все члены семейства иммуноглобулинов, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM или их фрагменты.

Иллюстративные конструкции CAR в соответствии с настоящим изобретением представлены в табл. 1.

Таблица 1

Название конструкции	scFv	Костимулирующий домен	Активирующий домен
1H2.1 CD28T	1H2.1	CD28T	CD3-дзета
1H2.1 4-1BB	1H2.1	4-1BB	CD3-дзета
8D2 CD28T	8D2	CD28T	CD3-дзета
8D2 4-1BB	8D2	4-1BB	CD3-дзета
6B2 CD28T	6B2	CD28T	CD3-дзета
6B2 4-1BB	6B2	4-1BB	CD3-дзета

Домены по отношению к клетке

Следует понимать, что по отношению к клетке, несущей рецептор, сконструированные Т-клетки по настоящему изобретению содержат антигенсвязывающую молекулу (такую как scFv), внеклеточный домен (который может включать "шарнирный" домен), трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен предусматривает, по меньшей мере частично, активирующий домен, предпочтительно состоящий из члена семейства CD3, такого как CD3-дзета, CD3-эпсилон, CD3-гамма или их частей. Кроме того, следует понимать, что антигенсвязывающая молекула (например, один или несколько scFv) сконструирована таким образом, что она расположена во внеклеточной части молекулы/конструкции, так что она способна распознавать и связываться со своей мишенью или мишенями.

Внеклеточный домен. Внеклеточный домен полезен для передачи сигналов и для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Внеклеточные домены, используемые в настоящем изобретении, могут происходить из (т. е. содержать) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1), индуцибельного Т-клеточного костимулятора (ICOS), функционально-ассоциированного антигена-1 лимфоцитов (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig-альфа (CD79a), DAP-10, Fc-гамма-рецептора, молекулы МНС класса I, рецепторных белков TNF, белка иммуноглобулина, рецептора цитокина, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL-2R-бета, IL-2R-гамма, IL-7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфически связывается с CD83, или любой их комбинации. Внеклеточный домен может происходить либо из природного, либо из синтетического источника.

Как описано в данном документе, внеклеточные домены часто включают шарнирную часть. Это часть внеклеточного домена, иногда называемая "спейсерной" областью. В соответствии с настоящим изобретением можно использовать различные шарнирные области, включая костимулирующие молекулы, как обсуждалось выше, а также последовательности иммуноглобулина (Ig) или другие подходящие молекулы для достижения требуемого заданного расстояния от клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления вся внеклеточная область содержит шарнирную область. В некоторых вариантах осуществ-

ствления шарнирная область содержит CD28T или домен EC CD28.

Трансмембранный домен. CAR можно сконструировать таким образом, чтобы он содержал трансмембранный домен, который слит с внеклеточным доменом CAR. Аналогичным образом, он может быть слит со внутриклеточным доменом CAR. В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который в природе ассоциирован с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован посредством аминокислотной замены так, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других белков поверхностной мембраны с тем, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен может происходить либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, то домен может происходить из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области, используемые в настоящем изобретении, могут происходить из (т. е. содержать) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белка 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1), индуцибельного Т-клеточного костимулятора (ICOS), функционально-ассоциированного антигена-1 лимфоцитов (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig-альфа (CD79a), DAP-10, Fc-гамма-рецептора, молекулы МНС класса 1, рецепторных белков TNF, белка иммуноглобулина, рецептора цитокина, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL-2R-бета, IL-2R-гамма, IL-7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфически связывается с CD83, или любой их комбинации.

Необязательно, короткие линкеры могут образовывать связи между всеми или некоторыми внеклеточными, трансмембранными и внутриклеточными доменами CAR.

В одном варианте осуществления трансмембранный домен в CAR по настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD8. В одном варианте осуществления трансмембранный домен CD8 содержит трансмембранную часть последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13. В другом варианте осуществления трансмембранный домен CD8 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует трансмембранную аминокислотную последовательность, содержащуюся в SEQ ID NO: 14.

В определенных вариантах осуществления трансмембранный домен в CAR по настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD28. В одном варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 5. В одном варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6

Внутриклеточный (цитоплазматический) домен. Внутриклеточный (цитоплазматический) домен сконструированных Т-клеток по настоящему изобретению может обеспечивать активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки. Эффекторной функцией Т-клетки может быть, например, цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов.

Будет понятно, что подходящие внутриклеточные молекулы включают (т. е. содержат) без ограничения CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, белок 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1), индуцибельный Т-клеточный костимулятор (ICOS), функционально-ассоциированный антиген-1 лимфоцитов (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig-альфа (CD79a), DAP-10, Fc-гамма-рецептор, молекулу МНС класса 1, рецепторные белки TNF, белок иммуноглобулина, рецептор цитокина, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, рецептор лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL-2R-бета, IL-2R-гамма, IL-7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд, который специфически связывается с CD83, или любую их комбинацию.

В предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR может быть сконструирован таким образом, чтобы содержать сигнальный домен CD3-дзета отдельно или в комбинации с любым другим требуемым(ыми) цитоплазматическим(и) доменом(ами), применимым(ыми) в контексте CAR по настоящему изобретению. Например, цитоплазматический домен CAR может содержать часть цепи CD3-дзета и костимулирующую сигнальную область.

Цитоплазматические сигнальные последовательности в цитоплазматической сигнальной части CAR по настоящему изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке.

В одном предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В другом варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB, где цитоплазматический CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 16. В другом варианте осуществления цитоплазматический домен в CAR по настоящему изобретению сконструирован так, чтобы содержать часть CD28 и CD3-дзета, где цитоплазматический CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную под SEQ ID NO: 7, и аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8. Последовательность нуклеиновой кислоты CD3-дзета представлена под SEQ ID NO: 9, и аминокислотная последовательность представлена под SEQ ID NO: 8.

Следует понимать, что одна предпочтительная ориентация CAR в соответствии с настоящим изобретением предусматривает антигенсвязывающий домен (такой как scFv) в тандеме с костимулирующим доменом и активирующим доменом. Костимулирующий домен может содержать одну или несколько из внеклеточной части, трансмембранной части и внутриклеточной части. Кроме того, следует понимать, что несколько костимулирующих доменов могут использоваться в тандеме.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены нуклеиновые кислоты, содержащие промотор, функционально связанный с первым полинуклеотидом, кодирующим антигенсвязывающую молекулу, по меньшей мере одну костимулирующую молекулу и активирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из группы, состоящей из ретровирусных векторов, векторов на основе вируса лейкемии мышей, векторов SFG, аденовирусных векторов, лентивирусных векторов, векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV), векторов на основе вируса герпеса и векторов на основе вируса осповакцины. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержится в плазмиде.

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим химерные антигенные рецепторы, и векторам, содержащим полинуклеотиды. Для настоящего изобретения может подходить любой вектор, известный из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор (такой как rMSVGI), ДНК-вектор, вектор на основе вируса лейкемии мышей, вектор SFG, плазмиду, РНК-вектор, аденовирусный вектор, бакуловирусный вектор, вектор на основе вируса Эпштейна-Барр, паповавирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, вектор на основе вируса простого герпеса, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусный вектор (такой как rGAR) или любую их комбинацию. Карта вектора rGAR показана на фиг. 7. Последовательность rGAR является следующей:

```

CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACG
CGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGTTTCTT
CCSTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGC
TCCSTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGAT
TAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCSTTT
GACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACA
CTCAACCSTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGC
СТАТТGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACA AAAATTTAACGCGAATTTTAACAAA
АТАТТАACGCTТАСААТТТGCCАТТCGCCАТТCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAG
GGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGC
TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGТААА
ACGACGGCCAGTGAATTGТААТACGACTCACTАТАGGGCGACCCGGGGATGGCG
CGCCAGТААТСААТТАCGGGGTCАТТАGTTCAТАGCCАТАТАТGGAGTTCCGCG
TTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCC
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGТАACGCCAАТАGGGACTTTCCAT

```

TGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG
TGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCG
CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT
ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
GCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTC
AATGGGAGTTTGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT
AAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGGTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCT
GGGAGCTCTGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCC
TTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGAT
CCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCCGAACAGG
GACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTT
GCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGGCAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAA
AATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTAT
TAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGG
AAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACG
ATTCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTG
GGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATA
ATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCA
AGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCA
CAGCAAGCCGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTG
GAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGC
ACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAA
TAGGAGCTTTGTTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGC
GTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGCTGGTATAGTGCAGCAG
CAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAG
TCTGGGGCATCAAGCAGTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAA
AGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACCAC
TGCTGTGCCTTGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAAT
CACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATA

CACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTA
TTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTGGC
TGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAAT
AGTTTTTGTCTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTAT
CGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG
AAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGAT
CTCGACGGTATCGGTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTG
CAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAATAAAGAATTAC
AAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTATCGCGATCGCGGAATGAAAGACCCC
ACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAA
TACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCA
GAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGC
CAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCA
TCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGA
ACTAACCAATCAGTTCGTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTC
AATAAAAGAGCCCAACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCTTCGAAGTAGATCTT
TGTCGATCCTACCATCCACTCGACACACCCGCCAGCGGCCGCTGCCAAGCTTCCG
AGCTCTCGAATTAATTCACGGTACCCACCATGGCCTAGGGAGACTAGTCGAATCG
ATATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATG
TTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTG
CTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT
ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGC
TGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGC
CCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTCG
GGGAAGCTGACGTCCTTTTTCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCG
CGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCC
GCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACG
AGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCCGCTGGTTAATTAAGTACCTTTAAGA
CCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAGGGGG

GACTGGAAGGGCGAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTAC
TGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGG
AACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTG
CCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTG
TGAAAATCTCTAGCAGGCATGCCAGACATGATAAGATAATTGATGAGTTTGA
CAAACCACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATG
CTATTGCTTTATTTGTAACCATATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAA
TTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTACAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTGGCGCG
CCATCGTCGAGGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGAGCTTGGCGTAATCATGG
TCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACG
AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAC
ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTTCGTGCCAGC
TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGGTTTTGCGTATTGGGCGCTC
TTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCAGCGG
TATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC
AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGG
CCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAA
TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG
GATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGC
TG TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
AACCCCCGTTT CAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC
AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGGCCTAACT
ACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAC
CTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGC
GGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAG
AAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACG
TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAA
ATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGA

CAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTT
 CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTT
 ACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCA
 GATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCT
 GCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAA
 GTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTG
 GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAG
 GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCT
 CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAG
 CACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT
 GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGGCACCAGAGTTGCTCTT
 GCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTAAAAAGTGCT
 CATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG
 AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTAC
 TTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAA
 GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTTCCTTTTCAATAT
 TATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTAT
 TTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC
 (SEQ ID NO:70)

Подходящие дополнительные иллюстративные векторы включают, например, pBABE-puro, pBABE-neo largeTcDNA, pBABE-hygro-hTERT, pMKO.1 GFP, MSCV-IRES-GFP, pMSCV PIG (пустая плазида Puro IRES GFP), pMSCV-loxp-dsRed-loxp-eGFP-Puro-WPRE, MSCV IRES Luciferase, pMIG, MDH1-PGK-GFP2.0, TtRMPVIR, pMSCV-IRES-mCherry FP, pRetroX GFP T2A Cre, pRXTN, pLncEXP и pLXIN-Luc.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная клетка представляет собой Т-клетку, лимфоцит, инфильтрирующий опухоль (TIL), NK-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или NK-Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка выделена или получена из периферической крови. В некоторых вариантах осуществления клетка выделена или получена из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления клетка выделена или получена из костного мозга. В некоторых вариантах осуществления клетка выделена или получена из пуповинной крови. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка трансфицирована или трансдуцирована вектором на основе нуклеиновой кислоты с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из электропорации, сонопорации, биолистики (например, Gene Gun), липидной трансфекции, полимерной трансфекции, наночастиц или полиплексов.

В некоторых вариантах осуществления химерные антигенные рецепторы экспрессируются в сконструированных иммунных клетках, которые содержат нуклеиновые кислоты по настоящей заявке. Эти химерные антигенные рецепторы по настоящей заявке могут в некоторых вариантах осуществления содержать (i) антигенсвязывающую молекулу (такую как scFv), (ii) трансмембранную область и (iii) молекулу или область активации Т-клеток.

Антигенсвязывающие молекулы

Антигенсвязывающие молекулы находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающая молекула" означает любой белок, который связывает определенный целевой антиген. В данной заявке указанный целевой антиген представляет собой белок DLL3 или его фрагмент. Антигенсвязывающие молекулы включают без ограничения антитела и их связывающие части, такие как иммунологически функциональные фрагменты. Пептида (т. е. Fc-слитые молекулы, содержащие пептидсвязывающие домены) являются другим примером подходящих антигенсвязывающих молекул.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на опухолевой клетке. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на клетке, вовлеченной в гиперпролиферативное заболевание, или с вирусным или бактериальным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с DLL3. В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или его фрагмент, включая одну или несколько из его определяющих комплементарность областей (CDR). В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

Термин "иммунологически функциональный фрагмент" (или "фрагмент") антигенсвязывающей молекулы представляет собой разновидность антигенсвязывающей молекулы, содержащей часть (независимо от того, как эту часть получают или синтезируют) антитела, в которой отсутствуют по меньшей мере некоторые аминокислоты, присутствующие в полноразмерной цепи, но которая все еще способна специфически связываться с антигеном. Такие фрагменты являются биологически активными, так как они связываются с целевым антигеном и могут конкурировать с другими антигенсвязывающими молекулами, включая интактные антитела, за связывание с данным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фрагменты являются нейтрализующими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления фрагменты могут блокировать или снижать активность DLL3. В одном аспекте такой фрагмент будет сохранять по меньшей мере одну CDR, присутствующую в полноразмерной легкой или тяжелой цепях, и в некоторых вариантах осуществления будет содержать одну тяжелую цепь и/или легкую цепь или их часть. Эти фрагменты могут быть получены с помощью методик рекомбинантной ДНК или могут быть получены, например, посредством ферментативного или химического расщепления антигенсвязывающих молекул, включая интактные антитела.

Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулина включают без ограничения scFv-фрагменты, Fab-фрагменты (Fab', F(ab')₂ и т. п.), одну или несколько CDR, диатело (вариабельный домен тяжелой цепи на том же полипептиде, что и вариабельный домен легкой цепи, связанный с помощью короткого пептидного линкера, который является настолько коротким, чтобы не допустить спаривание между двумя доменами в одной цепи), доменные антитела и одноцепочечные антитела. Эти фрагменты могут быть получены из любого источника, представляющего собой млекопитающее, включая без ограничения человека, мышшь, крысу, верблюдовых или кролика. Как будет понятно специалисту в данной области, антигенсвязывающая молекула может включать небелковые компоненты.

Варианты антигенсвязывающих молекул также находятся в пределах объема настоящего изобретения, например, вариабельные легкие и/или вариабельные тяжелые цепи, каждая из которых характеризуется по меньшей мере 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, 97-99% или более чем 99% идентичностью с аминокислотными последовательностями последовательностей, описанных в данном документе. В некоторых случаях такие молекулы содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, тогда как в других случаях варианты формы содержат две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи (или их субчасти). Специалист в данной области сможет определить подходящие варианты антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, с применением хорошо известных методик. В определенных вариантах осуществления специалист в данной области может идентифицировать подходящие зоны молекулы, которые можно изменять, не нарушая ее активность, за счет нацеливания на области, которые не считаются важными для активности.

В определенных вариантах осуществления полипептидная структура антигенсвязывающих молекул основана на антителах, включая без ограничения моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе "миметиками антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые антитела (иногда называемые в данном документе "конъюгатами антител") и их фрагменты, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит авимеры или состоит из них.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающуюся молекулу, связывающуюся с DLL3, вводят отдельно. В других вариантах осуществления антигенсвязывающуюся молекулу, связывающуюся с DLL3, вводят как часть CAR, TCR или другой иммунной клетки. В таких иммунных клетках антигенсвязывающаяся молекула, связывающаяся с DLL3, может находиться под регуляцией той же промоторной области или отдельного промотора. В некоторых вариантах осуществления гены, кодирующие белковые вещества и/или антигенсвязывающуюся молекулу, связывающуюся с DLL3, могут находиться в отдельных векторах.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающуюся молекулу, связывающуюся с DLL3, вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или вспомогательным веществом. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции будут включать более чем одну антигенсвязывающуюся молекулу, связывающуюся с DLL3. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции будут включать более чем одну антигенсвязывающуюся молекулу, связывающуюся с DLL3, где антигенсвязывающиеся молекулы, связывающиеся с DLL3, связывают более чем один эпитоп. В некоторых вариантах осуществления различные антигенсвязывающие молекулы не будут конкурировать друг с другом за связывание с DLL3.

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть выбрана для парентеральной доставки, для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, как например перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетенции специалиста в данной области. В определенных вариантах осуществления для поддержания композиции при физиологическом pH или при немного более низком pH, как правило, pH в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 8, используют буферы. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения, когда предполагается парентеральное введение, терапевтическая композиция может находиться в форме апиrogenного парентерально приемлемого водного раствора, содержащего требуемую антигенсвязывающую молекулу, связывающуюся с DLL3, с дополнительными терапевтическими средствами или без них, в фармацевтически приемлемой среде-носителе. В определенных вариантах осуществления среда-носитель для парентеральной инъекции представляет собой стерильную дистиллированную воду, в которой антигенсвязывающая молекула, связывающаяся с DLL3, с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством или без него составлена в виде стерильного изотонического раствора, надлежащим образом законсервированного. В определенных вариантах осуществления получение может включать составление требуемой молекулы с полимерными соединениями (такими как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулами или липосомами, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством депо-инъекции. В определенных вариантах осуществления имплантируемые изделия для доставки лекарственных средств могут использоваться для введения требуемой молекулы.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула используется в качестве инструмента диагностики или валидации. Антигенсвязывающая молекула может использоваться для анализа количества DLL3, присутствующего в образце и/или субъекте. В некоторых вариантах осуществления диагностическая антигенсвязывающая молекула не является нейтрализующей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы, раскрытые в данном документе, используются или предусмотрены в наборе для анализа и/или способе выявления DLL3 в тканях или клетках млекопитающих с целью скрининга/диагностики заболевания или нарушения, связанных с изменениями уровней DLL3. Набор может содержать антигенсвязывающую молекулу, которая связывает DLL3, вместе со средствами для отображения связывания антигенсвязывающейся молекулы, связывающейся с DLL3, если она присутствует, и необязательно уровней белка DLL3.

Антигенсвязывающие молекулы следует понимать далее с учетом приведенных ниже определений и описаний.

Область "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH1 и CH2 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и посредством гидрофобных взаимодействий доменов CH3.

"Fab-фрагмент" содержит одну легкую цепь и CH1 и переменные области одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. "Фрагмент Fab" содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен VH и домен CH1, а также область между доменами CH1 и CH2, так что между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')₂. "Фрагмент F(ab')₂" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами CH1 и CH2, так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, фрагмент F(ab')₂ состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

"Область Fv" содержит переменные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но не содержит константных областей.

"Одноцепочечный переменный фрагмент" ("scFv", также именуемый "одноцепочечным антителом") относится к молекулам Fv, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей соединены гибким линкером с образованием одной полипептидной цепи, которая образует антигенсвязывающую область. См. заявку согласно PCT WO88/01649 и патенты США №№ 4946778 и 5260203, описания которых включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме.

"Бивалентная антигенсвязывающая молекула" содержит два антигенсвязывающих сайта. В некоторых случаях два связывающих сайта характеризуются одинаковой антигенной специфичностью. Бивалентные антигенсвязывающие молекулы могут быть биспецифическими. "Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула" представляет собой молекулу, мишенью которой является более чем один антиген или эпитоп. "Биспецифическая", "с двойной специфичностью" или "бифункциональная" молекула представляет собой соответственно гибридную антигенсвязывающую молекулу или антитело, имеющие два разных антигенсвязывающих сайта. Два связывающих сайта биспецифической антигенсвязывающей молекулы будут связывать два разных эпитопа, которые могут располагаться на одном и том же или разных белках-мишенях.

Говорят, что антигенсвязывающая молекула "специфически связывает" свой целевой антиген, в случае если константа диссоциации (K_d) составляет $\sim 1 \times 10^{-7}$ М. Антигенсвязывающая молекула специфически связывает антиген с "высокой аффинностью", в случае если K_d составляет $1-5 \times 10^{-9}$ М, и с "очень высокой аффинностью", в случае если K_d составляет $1-5 \times 10^{-10}$ М. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула характеризуется K_d , составляющей 10^{-9} М. В одном варианте осуществления скорость диссоциации составляет $< 1 \times 10^{-5}$. В других вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы будут связываться с DLL3 человека с K_d , составляющей от приблизительно 10^{-7} М до 10^{-13} М, и в еще одном варианте осуществления антигенсвязывающие молекулы будут связываться с K_d , составляю-

щей $1,0-5 \times 10^{-10}$.

Говорят, что антигенсвязывающая молекула является "селективной", когда она связывается с одной мишенью более плотно, чем со второй мишенью.

Термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину любого изотипа или его фрагменту, который может конкурировать с интактным антителом за специфическое связывание с целевым антигеном, и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. "Антитело" представляет собой разновидность антигенсвязывающей молекулы, как определено в данном документе. Интактное антитело обычно будет содержать по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, однако в некоторых случаях может включать меньше цепей, как например, антитела, встречающиеся в природе у верблюдовых, могут содержать только тяжелые цепи. Антитела могут быть получены исключительно из одного источника или могут быть химерными, т. е. разные части антитела могут быть получены из двух разных антител, как дополнительно описано ниже. Антигенсвязывающие молекулы, антитела или связывающие фрагменты могут быть получены в гибридомах посредством методик рекомбинантной ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. Если не указано иное, то термин "антитело" включает, помимо антител, содержащих две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, их производные, варианты, фрагменты и мутеины, примеры которых описаны ниже. Кроме того, если это не исключено в явном виде, антитела включают соответственно моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе "миметиками антител"), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые антитела (иногда называемые в данном документе "конъюгатами антител") и их фрагменты.

Вариабельные области, как правило, характеризуются одинаковой общей структурой относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных 3 гипервариабельными областями (т. е. "CDR"). CDR из двух цепей каждой пары, как правило, выровнены по каркасным областям, что может обеспечивать связывание со специфическим эпитопом. От N-конца к C-концу вариабельные области как легкой, так и тяжелой цепей, как правило, содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. По согласию, CDR-области в тяжелой цепи, как правило, называются CDR1, CDR2 и CDR3 HC. CDR-области в легкой цепи, как правило, называют CDR1, CDR2 и CDR3 LC. Отнесение аминокислот к каждому домену, как правило, соответствует определениям согласно Kabat (Seqs of Proteins of Immunological Interest (NIH, Bethesda, MD (1987 and 1991)) или Chothia (J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al, Nature, 342:878-883 (1989)). Для определения или аппроксимации CDR-областей можно использовать различные способы анализа, включая не только определение согласно Kabat или Chothia, но также определение согласно AbM.

Термин "легкая цепь" включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь включает домен вариабельной области V_L и домен константной области C_L . Домен вариабельной области легкой цепи находится на аминоконце полипептида. Легкие цепи включают каппа-цепи и лямбда-цепи.

Термин "тяжелая цепь" включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность вариабельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь содержит домен вариабельной области V_H и три домена константной области CH1, CH2 и CH3. Домен V_H находится на аминоконце полипептида, а домены C_H находятся на карбоксильном конце, причем ближе всех к карбоксильному концу полипептида находится CH3. Тяжелые цепи могут относиться к любому изотипу, включая IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Термины "вариабельная область" или "вариабельный домен" относятся к части легкой и/или тяжелой цепей антитела, как правило, содержащей примерно 120-130 аминоконцевых аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно 100-110 аминоконцевых аминокислот в легкой цепи. Вариабельная область антитела, как правило, определяет специфичность конкретного антитела в отношении его мишени.

Вариабельность неравномерно распределена на протяжении вариабельных доменов антител; она сконцентрирована в субдоменах каждого из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Эти субдомены называются "гипервариабельными областями" или "определяющими комплементарность областями" (CDR). Более консервативные (т. е. не являющиеся гипервариабельными) части вариабельных доменов называются "каркасными" областями (FRM или FR) и обеспечивают каркас для шести CDR в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Каждый из встречающихся в природе вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей содержит четыре FRM-области (FR1, FR2, FR3 и FR4), принимающих большей частью P-складчатую конфигурацию, соединенных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях образующие, часть P-складчатой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FRM и с гипервариабельными областями из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта (см. Kabat et al., loc. cit).

Термин "CDR" и его множественное число относятся к определяющей комплементарности области,

три из которых придают связывающий характер варибельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), а еще три придают связывающий характер варибельной области тяжелой цепи (CDRH1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большинство остатков, отвечающих за специфические взаимодействия антитела с антигеном, а следовательно способствуют функциональной активности молекулы антитела: они являются основными детерминантами специфичности в отношении антигена.

Точное определение границ и размеров CDR является предметом различных классификаций и систем нумерации. Соответственно, CDR могут быть указаны согласно Kabat, Chothia, контактной или любой другой системе определения границ, включающей систему нумерации, описанную в данном документе. Несмотря на различающиеся границы, каждая из этих систем имеет определенную степень перекрытия, представляющую так называемые "гиперварибельные области" в варибельных последовательностях. Следовательно, определения CDR в соответствии с этими системами могут отличаться по длине и граничным участкам по отношению к прилегающей каркасной области. См. например Kabat (подход, основанный на межвидовой варибельности последовательностей), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело) и/или MacCallum (Kabat et al., loc. cit; Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-917 и MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для характеристики антигенсвязывающего сайта является определение AbM, используемое в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains в *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В тех случаях, когда две методики идентификации остатков определяют области как перекрывающиеся, но не идентичные области, их можно комбинировать для определения гибридной CDR. Однако нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat является предпочтительной.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к основной конформации цепи, принимаемой антигенсвязывающими петлями (CDR). В результате сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют лишь ограниченный набор доступных конформаций. Каждая каноническая структура может характеризоваться спиральными углами полипептидного остова. Следовательно, соответствующие петли между антителами могут характеризоваться высокой степенью подобия трехмерных структур, несмотря на высокую аминокислотную варибельность в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia et al., *Nature*, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между структурой, принимаемой петлей, и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация определенного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях внутри петли, а также в консервативном каркасе (т. е. вне петли). Следовательно, распределение в конкретный канонический класс может быть осуществлено на основании присутствия этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать аспекты, относящиеся к линейной последовательности антитела, например перечисленные согласно Kabat (Kabat et al., loc. cit). Схема (система) нумерации согласно Kabat является широко распространенным стандартом нумерации аминокислотных остатков варибельного домена антитела последовательным образом и является предпочтительной схемой, используемой в настоящем изобретении, что также упоминается в другом месте данного документа. Для определения канонической структуры антитела также можно использовать дополнительные структурные факторы. Например, те различия, которые не полностью отражены в нумерации согласно Kabat, могут быть описаны системой нумерации согласно Chothia et al. и/или выявлены другими методиками, например, кристаллографией и двумерным или трехмерным компьютерным моделированием. Соответственно, указанную последовательность антитела можно поместить в канонический класс, что позволяет, среди прочего, проводить идентификацию соответствующих последовательностей каркасных областей (например, на основании требования включить различные канонические структуры в библиотеку). Система нумерации аминокислотных последовательностей антител согласно Kabat и структурные особенности, описанные Chothia et al, loc. cit, а также их значение для интерпретации канонических аспектов структуры антитела, описаны в литературе. Структурные субъединицы и трехмерные конфигурации иммуноглобулинов различных классов хорошо известны из уровня техники. В отношении обзора структуры антитела см. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи, и в частности CDR3 тяжелой цепи, могут составлять наиболее важные детерминанты связывания антигена в пределах варибельных областей легкой и тяжелой цепей. В некоторых конструкциях на основе антител CDR3 тяжелой цепи, по-видимому, составляет основную область контакта между антигеном и антителом. Схемы отбора *in vitro*, в которых изменяется только CDR3, можно использовать для изменения свойств связывания антитела или определения того, какие остатки вносят вклад в связывание антигена. Следовательно, CDR3, как правило, является самым большим источником молекулярного разнообразия в пределах связывающего сайта антитела. Например, длина H3 может составлять всего два аминокислотных остатка или более чем 26 аминокислот.

Термин "нейтрализация" относится соответственно к антигенсвязывающей молекуле, scFv или ан-

тителу, которые связываются с лигандом и предотвращают или снижают биологический эффект этого лиганда. Это может осуществляться, например, с помощью непосредственной блокировки сайта связывания на лиганде или с помощью связывания с лигандом и изменения способности лиганда к связыванию посредством не прямых механизмов (таких как структурные или энергетические изменения в лиганде). В некоторых вариантах осуществления термин может также обозначать антигенсвязывающую молекулу, которая препятствует белку, с которым она связана, выполнять биологическую функцию.

Термины "мишень" или "антиген" относятся к молекуле или части молекулы, способной к связыванию антигенсвязывающей молекулой. В некоторых вариантах осуществления мишень может иметь один или несколько эпитопов.

Термин "конкурировать", когда он применяется в контексте антигенсвязывающих молекул, которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими молекулами, как определено с помощью анализа, в котором подвергаемая тестированию антигенсвязывающая молекула (например, антитело или его иммунологический функциональный фрагмент) предупреждает или ингибирует (например, снижает) специфическое связывание иллюстративной антигенсвязывающей молекулы с антигеном. Для определения того, конкурирует ли одна антигенсвязывающая молекула с другой, можно использовать многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или не прямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или не прямой иммуоферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой EIA с биотином-авидином (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный анализ с использованием прямого мечения, твердофазный сэндвич-анализ с использованием прямого мечения (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный RIA с использованием прямого мечения с использованием 1-125 в качестве метки (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой EIA с биотином-авидином (Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552) и RIA с использованием прямого мечения (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Термин "эпитоп" включает любую детерминанту, способную связываться антигенсвязывающей молекулой, такой как scFv, антитело или иммунная клетка по настоящему изобретению. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антигенсвязывающей молекулой, мишенью которой является этот антиген, и в случае если антиген представляет собой белок - включает в себя специфические аминокислоты, которые непосредственно связываются с антигенсвязывающей молекулой.

Используемые в данном документе термины "метка" или "меченый" относятся к включению выявляемого маркера, например, путем включения радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду фрагментов биотина, которые могут быть выявлены меченым авидином (например, стрептавидином, содержащим флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которые могут быть выявлены оптическими или колориметрическими способами). В некоторых вариантах осуществления метка или маркер также могут быть терапевтическими. Из уровня техники известны и могут применяться различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов.

В соответствии с настоящим изобретением в данный документ могут быть включены переключатели типа "включение-выключение" или другие типы методик переключения управления. Эти методики могут включать использование доменов димеризации и необязательных активаторов димеризации таких доменов. Эти методики включают, например, методики, описанные Wu et al., *Science* 2014 350 (6258) с использованием систем димеризации FKBP/Rapalog в определенных клетках, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительная технология димеризации описана, например, в Fegan et al. *Chem. Rev.* 2010, 110, 3315-3336 а также в патентах США № 5830462; 5834266; 5869337 и 6165787, содержание которых также в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные пары димеризации могут включать циклоспорин-А/рецептор циклофилина, эстроген/рецептор эстрогена (необязательно с использованием тамоксифена), глюкокортикоиды/рецептор глюкокортикоидов, тетрациклин/рецептор тетрациклина, витамин D/рецептор витамина D. Дополнительные примеры технологии димеризации можно найти, например, в WO 2014/127261, WO 2015/090229, US 2014/0286987, US 2015/0266973, US 2016/0046700, патентах США №№ 8486693, US 2014/0171649 и US 2012/0130076, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Способы лечения

С использованием адоптивной иммунотерапии нативные Т-клетки могут быть (i) выделены из пациента, (ii) генетически сконструированы так, чтобы экспрессировать химерный антигенный рецептор (CAR), который связывается с по меньшей мере одним опухолевым антигеном, (iii) размножены *ex vivo* до более крупной популяции сконструированных Т-клеток и (iv) повторно введены пациенту. См., например, патенты США №№ 7741465 и 6319494, Eshhar et al. (*Cancer Immunol, supra*); Krause et al. (выше); Finney et al. (выше). После того, как сконструированные Т-клетки повторно вводят пациенту, они опосредуют иммунный ответ против клеток, экспрессирующих опухолевый антиген. См., например, Krause et al., *J. Exp. Med.*, Volume 188, No. 4, 1998 (619-626). Этот иммунный ответ включает в себя секрецию IL-2 и других цитокинов Т-клетками, клональную экспансию Т-клеток, распознающих опухолевый анти-

ген, и опосредованное Т-клетками специфическое уничтожение клеток, содержащих мишень. См. Nombach et al., *Journal of Immun.* 167: 6123-6131 (2001).

Таким образом, в некоторых аспектах настоящее изобретение представляет способ лечения или предупреждения состояния, связанного с нежелательными и/или повышенными уровнями DLL3 у пациента, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества по меньшей мере одной выделенной антигенсвязывающей молекулы, CAR или TCR, раскрытой в данном документе.

Представлены способы лечения заболеваний или нарушений, включая рак. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к формированию опосредованного Т-клетками иммунного ответа у субъекта, предусматривающему введение субъекту эффективного количества сконструированных иммунных клеток согласно настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления опосредованный Т-клетками иммунный ответ направлен против клетки- или клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная клетка содержит химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой опухолевую клетку. В некоторых аспектах настоящее изобретение представляет способ лечения или предупреждения злокачественного новообразования, при этом указанный способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества по меньшей мере одной выделенной антигенсвязывающей молекулы, описанной в данном документе. В некоторых аспектах настоящее изобретение представляет способ лечения или предупреждения злокачественного новообразования, при этом указанный способ предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества по меньшей мере одной иммунной клетки, где иммунная клетка содержит по меньшей мере один химерный антигенный рецептор, Т-клеточный рецептор и/или выделенную антигенсвязывающую молекулу, как описано в данном документе.

В некоторых аспектах настоящее изобретение представляет фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одну антигенсвязывающую молекулу, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительное активное средство.

Антигенсвязывающие молекулы, CAR, TCR, иммунные клетки и т. п., по настоящему изобретению можно использовать для лечения миелоидных заболеваний, опухоли надпочечника, печени, почки, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, яичника, шейки матки, матки, пищевода, колоректальный рак, рак предстательной железы (например, аденокарциному предстательной железы), поджелудочной железы, легкого (как мелкоклеточный, так и немелкоклеточный), щитовидной железы, виды карциномы, саркомы, глиобластомы, опухоли головы и шеи, крупноклеточную нейроэндокринную карциному (LCNEC), медуллярный рак щитовидной железы, глиобластому, нейроэндокринный рак предстательной железы (NEPC), высокозлокачественный рак желудочно-кишечного тракта или поджелудочной железы (GEP) и злокачественную меланому.

Следует понимать, что целевые дозы для клеток CAR⁺/CAR-T⁺/TCR⁺ могут находиться в диапазоне от 1×10⁶ до 2×10¹⁰ клеток/кг, предпочтительно 2×10⁶ клеток/кг, более предпочтительно. Следует понимать, что дозы выше и ниже данного диапазона могут быть подходящими для определенных субъектов, и подходящие уровни доз могут быть определены врачом по необходимости. Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением могут быть предусмотрены множественные дозы клеток.

Также представлены способы уменьшения размера опухоли у субъекта, предусматривающие введение субъекту сконструированной клетки по настоящему изобретению, где клетка содержит химерный антигенный рецептор, Т-клеточный рецептор или Т-клеточный рецептор на основе химерного антигенного рецептора, содержащие антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с антигеном на опухоли. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет солидную опухоль или злокачественное новообразование крови, такое как лимфома или лейкемия. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка доставляется в ложе опухоли. В некоторых вариантах осуществления рак находится в костном мозге субъекта.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки представляют собой аутологичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки представляют собой аллогенные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки представляют собой гетерологичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки согласно настоящей заявке трансфицируют или трансдуцируют *in vivo*. В других вариантах осуществления сконструированные клетки трансфицируют или трансдуцируют *ex vivo*.

Способы могут дополнительно предусматривать введение одного или нескольких химиотерапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой средство для химиотерапевтической лимфодеплеции (предварительной обработки). Полезные схемы лечения с использованием предварительной обработки, вместе с соответствующими полезными биомаркерами, описаны в предварительных заявках на патенты США 62/262143 и 62/167750, которые включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме. В них описаны, например, способы предварительной обработки пациента, нуждающегося в терапии Т-клетками, предусматривающие введе-

ние пациенту определенных полезных доз циклофосфида (от 200 мг/м²/день до 2000 мг/м²/день) и определенных доз флударабина (от 20 мг/м²/день до 900 мг/м²/день). Предпочтительная схема введения доз включает лечение пациента, предусматривающее ежедневное введение пациенту приблизительно 500 мг/м²/день циклофосфида и приблизительно 60 мг/м²/день флударабина в течение трех дней перед введением пациенту терапевтически эффективного количества сконструированных Т-клеток.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающую молекулу, трансдуцированные (или иным образом сконструированные) клетки (такие как CAR или TCR) и химиотерапевтическое средство вводят в количестве, эффективном для лечения заболевания или состояния у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие раскрытые в данном документе CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, можно вводить в сочетании с любым количеством химиотерапевтических средств. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтиленфосфорамид и восстановленный триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамин оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихимицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пуромидин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностафин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепитиостан, тестостерон; ингибиторы синтеза гормонов коры надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; компенсаторы фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрин; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфомитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазононовая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb) и доксетаксел (Таксотер®, Rhone-Poulenc Roreg); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS2000; дифторметиломитин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Targetin™ (бексаротен), Panretin™ (алитретиноин); ONTAK™ (денилейкин-дифтитокс); эсперамицины; капецитабин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенных выше. В это определение также включены антигормональные средства, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ароматаза-ингибирующие 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенных выше. При необходимости также вводят комбинации химиотерапевтических средств, включая без ограничения СНОР, т. е. циклофосфамид (Cytoxan®), доксорубицин (гидроксидоксорубицин), винкристин (Oncovin®) и преднизон.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят в одно и то же время или в течение одной недели после введения сконструированной клетки или нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят в течение от 1 до 4 недель или от 1 недели до 1 месяца, от 1 недели до 2 месяцев, от 1 недели до 3 месяцев, от 1 недели до 6 месяцев, от 1 недели до 9 месяцев или от 1 недели до 12 месяцев после введения сконструированной клетки или нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят за по меньшей мере 1 месяц до введения клетки или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение двух или более химиотерапевтических средств.

В сочетании с описанными в данном документе композициями можно использовать различные дополнительные терапевтические средства. Например, потенциально полезные дополнительные терапевти-

ческие средства включают ингибиторы PD-1, такие как ниволумаб (Opdivo®), пембролизумаб (Keytruda®), пембролизумаб, пидилизумаб, и атезолизумаб.

Дополнительные терапевтические средства, подходящие для использования в комбинации с настоящим изобретением, включают без ограничения ибрутиниб (Imbruvica®), офатумумаб (Arzetta®), ритуксимаб (Rituxan®), бевацизумаб (Avastin®), трастузумаб (Herceptin®), трастузумаб эмтанзин (KADCYLA®), иматиниб (Gleevec®), цетуксимаб (Erbix®), панитумумаб (Vectibix®), катумаксомаб, ибри-тумомаб, офатумумаб, тозитумомаб, брентуксимаб, алемтузумаб, гемтузумаб, эрлотиниб, гефитиниб, вандетаниб, афатиниб, лапатиниб, нератиниб, акситиниб, маситиниб, пазопаниб, сунитиниб, сорафениб, тоцераниб, лестауртиниб, акситиниб, цедираниб, ленватиниб, нинтеданиб, пазопаниб, регорафениб, семаксаниб, сорафениб, сунитиниб, тивозаниб, тоцераниб, вандетаниб, энтректиниб, кабозантиниб, иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, понатиниб, радотиниб, босутиниб, лестауртиниб, руксолитиниб, пакритиниб, кобиметиниб, селуметиниб, траметиниб, биниметиниб, алектиниб, церитиниб, кризотиниб, афлиберцепт, адипотид, денилейкин-дифтитокс, ингибиторы mTOR, такие как эверолимус и темсиролимус, ингибиторы сигнального пути Hedgehog, такие как сонидегиб и висмодегиб, ингибиторы CDK, такие как ингибитор CDK (палбоциклиб).

В дополнительных вариантах осуществления композиция, содержащая CAR-содержащую иммунную клетку, может вводиться с противовоспалительным средством. Противовоспалительные средства или лекарственные средства включают без ограничения стероиды и глюкокортикоиды (включая бетаметазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные препараты (NSAID), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, препараты, подавляющие активность TNF, циклофосфамид и микроферлат. Примеры NSAID включают ибупрофен, напроксен, натрия напроксен, ингибиторы Cox-2 и салилаты. Примеры анальгетиков включают ацетаминофен, оксикодон, трамадол пропороксифена гидрохлорид. Примеры глюкокортикоидов включают кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или преднизон. Иллюстративные модификаторы биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров клеточной поверхности (например, CD4, CD5 и т. д.), ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты TNF (например, этанерцепт (ENBREL®), адалимумаб (HUMIRA®) и инфликсимаб (REMICADE®)), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Примеры DMARD включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (перорально (ауранофин) и внутримышечно) и миноциклин.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции вводят вместе с цитокином. Используемый в данном документе термин "цитокин" относится к белкам, высвобождаемым одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку как межклеточные медиаторы. Примерами цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. В число цитокинов входят гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионильный вариант гормона роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреостимулирующий гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста гепатоцитов (HGF); фактор роста фибробластов (FGF); пролактин; плацентарный лактоген; мюллерова ингибирующая субстанция; пептид, ассоциированный с мышинным гонадотропином; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов (NGF), такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный-CSF (M-CSF); гранулоцитарный-макрофагальный-CSF (GM-CSF) и гранулоцитарный-CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухоли, такой как TNF-альфа или TNF-бета; и другие полипептидные факторы, включая LIF и лиганд kit (KL). Используемый в данном документе термин "цитокин" включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток, а также биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной последовательностью.

В некоторых аспектах настоящее изобретение представляет антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с DLL3 с K_d , составляющей менее чем 100 пМ. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с K_d , составляющей менее чем 10 пМ. В других вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с K_d , составляющей менее чем 5 пМ.

Способы получения

Для получения полинуклеотидов, полипептидов, векторов, антигенсвязывающих молекул, иммунных клеток, композиций и т. п. в соответствии с настоящим изобретением можно применять различные известные методики.

Перед манипуляциями *in vitro* или генетической модификацией иммунных клеток, описанных в данном документе, клетки могут быть получены от субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки предусматривают Т-клетки. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из дозы крови, собранной у субъекта, с применением любого количества методик, известных специалисту в данной области, например разделение FICOLL™. Клетки предпочтительно могут быть получены из циркулирующей крови индивида с помощью афереза. Как правило, продукт афереза содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах осуществления клетки, собранные с помощью афереза, можно промывать для удаления фракции плазмы и помещать в соответствующий буфер или среду для последующей обработки. Клетки можно промывать с помощью PBS. Следует понимать, что можно использовать стадию промывания, например, с использованием полуавтоматической проточной центрифуги, например, устройства для обработки клеток Cobe™ 2991, Baxter CytoMate™ и т. п. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах или другом солевом растворе с буфером или без него. В некоторых вариантах осуществления нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из РВМС путем лизирования эритроцитов и истощения моноцитов, например, с помощью центрифугирования в градиенте PERCOLL™. Конкретная субпопуляция Т-клеток, такая как CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клетки, может быть далее выделена с помощью методов положительной или отрицательной селекции, известных из уровня техники. Например, обогащение популяции Т-клеток с помощью отрицательной селекции может быть достигнуто с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Одним из способов для использования в данном документе является сортировка и/или селекция клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которой используется коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения клеток CD4⁺ путем отрицательной селекции коктейль моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточная цитометрия и сортировка клеток также могут использоваться для выделения представляющих интерес популяций клеток для использования в настоящем изобретении.

РВМС можно использовать непосредственно для генетической модификации иммунными клетками (такими как CAR или TCR) с применением способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления после выделения РВМС далее могут быть выделены Т-лимфоциты, и при этом как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты можно отсортировать на субпопуляции не подвергавшихся воздействию, клетки памяти и эффекторные Т-клетки либо до, либо после генетической модификации и/или размножения.

В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ клетки дополнительно сортируют на не подвергавшиеся воздействию, центральные клетки памяти и эффекторные клетки путем идентификации поверхностных клеточных антигенов, которые связаны с каждым из этих типов CD8⁺ клеток. В некоторых вариантах осуществления экспрессия фенотипических маркеров центральных Т-клеток памяти включает CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127 и является отрицательной в отношении гранзима В. В некоторых вариантах осуществления центральные Т-клетки памяти представляют собой CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки являются отрицательными в отношении CD62L, CCR7, CD28 и CD127 и положительными в отношении гранзима В и перфорина. В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ Т-клетки дополнительно сортируют на субпопуляции. Например, CD4⁺ Т-хелперные клетки можно отсортировать на не подвергавшиеся воздействию, центральные клетки памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют поверхностные клеточные антигены.

Иммунные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с применением известных способов, или иммунные клетки могут быть активированы и размножены (или дифференцированы в случае клеток-предшественников) *in vitro* перед генетической модификацией. В другом варианте осуществления иммунные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицированы с помощью описанных в данном документе химерных антигенных рецепторов (например, трансдуцированы с помощью вирусного вектора, содержащего одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих CAR), а затем активированы и/или размножены *in vitro*. Способы активации и размножения Т-клеток известны из уровня техники и описаны, например, в патенте США № 6905874; патенте США №

6867041; патенте США № 6797514 и PCT WO2012/079000, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Такие способы обычно включают приведение в контакт РВМС или выделенных Т-клеток со стимулирующим средством и костимулирующим средством, таким как антитела к CD3 и CD28, обычно прикрепленные к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с соответствующими цитокинами, такими как IL-2. Антитела к CD3 и CD28, прикрепленные к одной и той же грануле, служат в качестве "суррогатных" антигенпрезентирующих клеток (APC). Одним из примеров является система Dynabeads®, система активации/стимуляции CD3/CD28 для физиологической активации Т-клеток человека.

В других вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для пролиферации с помощью питающих клеток и соответствующих антител и цитокинов с применением способов, таких как те, что описаны в патенте США № 6040177; патенте США № 5827642 и WO2012129514, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Некоторые способы получения конструкций и сконструированных иммунных клеток по настоящему изобретению описаны в PCT-заявке PCT/US15/14520, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные способы получения конструкций и клеток можно найти в предварительной заявке на патент США № 62/244036, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Следует понимать, что РВМС могут дополнительно включать другие цитотоксические лимфоциты, такие как NK-клетки или NKT-клетки. Вектор экспрессии, несущий кодирующую последовательность химерного рецептора, как раскрыто в данном документе, может быть введен в популяцию донорских Т-клеток, NK-клеток или NKT-клеток человека. Успешно трансдуцированные Т-клетки, несущие вектор экспрессии, могут быть отсортированы с использованием проточной цитометрии для выделения CD3-положительных Т-клеток, а затем размножены для увеличения количества этих CAR-экспрессирующих Т-клеток, в дополнение к активации клеток с помощью антител к CD3 и IL-2 или других способов, известных из уровня техники, как описано в другом месте данного документа. Для криоконсервации Т-клеток, экспрессирующих CAR, для хранения и/или получения для использования у человека используют стандартные процедуры. В одном варианте осуществления трансдукцию, культивирование и/или размножение Т-клеток *in vitro* осуществляют в отсутствие продуктов животного происхождения, за исключением человеческого происхождения, таких как фетальная телячья сыворотка и фетальная бычья сыворотка.

Для клонирования полинуклеотидов вектор может быть введен в клетку-хозяина (выделенную клетку-хозяина), для обеспечения репликации самого вектора и амплифицирования тем самым копии содержащегося в нем полинуклеотида. Клонирование векторов может содержать компоненты последовательности, обычно включающие без ограничения точку начала репликации, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. При необходимости, эти элементы могут быть выбраны специалистом средней квалификации в данной области. Например, точка начала репликации может быть выбрана так, чтобы способствовать автономной репликации вектора в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенные клетки-хозяева, содержащие вектор, представленные в данном документе. Клетки-хозяева, содержащие вектор, могут быть полезны для экспрессии или клонирования полинуклеотида, содержащегося в векторе. Подходящие клетки-хозяева могут включать без ограничения прокариотические клетки, клетки грибов, дрожжевые клетки или высшие эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. Подходящие для данной цели прокариотические клетки включают без ограничения эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis, Pseudomonas, такие как P. aeruginosa, и Streptomyces.

Вектор может быть введен в клетку-хозяина с использованием любых подходящих способов, известных из уровня техники, включая без ограничения доставку, опосредованную DEAE-декстраном, способ осаждения фосфата кальция, доставку, опосредованную катионными липидами, трансфекцию, опосредованную липосомами, электропорацию, бомбардировку микрочастицами, рецептор-опосредованную доставку генов, доставку, опосредованную полилизинном, гистонном, хитозаном и пептидами. Стандартные способы трансфекции и трансформации клеток для экспрессии представляющего интерес вектора хорошо известны из уровня техники. В дополнительном варианте осуществления смесь различных векторов экспрессии можно использовать для генетической модификации донорской популяции иммунных эффекторных клеток, где каждый вектор кодирует разный CAR, как раскрыто в данном документе. Полученные трансдуцированные иммунные эффекторные клетки образуют смешанную популяцию сконструированных клеток, при этом часть сконструированных клеток экспрессирует более чем один разный CAR.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ хранения генетически сконструированных клеток, экспрессирующих CAR или TCR, мишенью которых является белок

DLL3. Это включает криоконсервацию иммунных клеток с тем, чтобы клетки оставались жизнеспособными при оттаивании. Часть иммунных клеток, экспрессирующих CAR, может быть криоконсервирована посредством способов, известных из уровня техники, чтобы обеспечить постоянный источник таких клеток для будущего лечения пациентов, страдающих злокачественным новообразованием. При необходимости, криоконсервированные трансформированные иммунные клетки можно размораживать, выращивать и размножать для получения большего количества таких клеток.

Используемый в данном документе термин "криоконсервация" относится к консервации клеток путем охлаждения до отрицательных температур, таких как (как правило) 77 Кельвинов или -196°C (точка кипения жидкого азота). Криозащитные средства часто используются при отрицательных температурах, чтобы предупредить повреждение клеток из-за замораживания при низких температурах или нагревания до комнатной температуры. Криоконсерванты и оптимальная скорость охлаждения могут защитить клетки от повреждения. Криозащитные средства, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничения: диметилсульфоксид (DMSO) (Lovelock & Bishop, Nature (1959); 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature (1961); 190: 1204-1205), глицерин, поливинилпирролидин (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci. (1960); 85: 576) и полиэтиленгликоль (Sloviter & Ravdin, Nature (1962); 196: 48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет от 1° до $3^{\circ}\text{C}/\text{минута}$.

Термин "практически чистый" используется для обозначения того, что присутствует высокий уровень данного компонента. Желательно, чтобы компонент являлся преобладающим компонентом, присутствующим в композиции. Предпочтительно, чтобы он присутствовал на уровне более 30%, более 50%, более 75%, более 90% или даже более 95%, причем указанный уровень определяется на основе соотношения сухого веса и сухого веса относительно всей рассматриваемой композиции. При очень высоких уровнях (например, при уровнях более 90%, более 95% или более 99%) компонент можно рассматривать как находящийся в "чистой форме". Биологически активные вещества по настоящему изобретению (включая полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот, антигенсвязывающие молекулы, фрагменты) могут быть представлены в форме, которая практически не содержит одного или нескольких загрязняющих веществ, с которыми в противном случае могло бы быть ассоциировано указанное вещество. Когда композиция практически не содержит данного загрязняющего вещества, - загрязняющее вещество будет присутствовать на низком уровне (например, на уровне менее 10%, менее 5% или менее 1% на основе соотношения сухого веса и сухого веса, указанного выше).

В некоторых вариантах осуществления клетки составляют, собирая их сначала из культуральной среды, а затем промывая и концентрируя клетки в среде и контейнерной системе, подходящей для введения ("фармацевтически приемлемый" носитель), в эффективном для лечения количестве. Подходящей инфузионной средой может быть любой состав изотонической среды, как правило, физиологический солевой раствор, NormosolTM R (Abbott) или Plasma-LyteTM A (Baxter), но также можно использовать 5% декстрозу в воде или лактат Рингера. Инфузионная среда может быть дополнена человеческим сывороточным альбумином.

Требуемое количество клеток для лечения в композиции обычно составляет по меньшей мере 2 клетки (например, по меньшей мере 1 из субпопуляции центральных CD8^+ Т-клеток памяти и по меньшей мере 1 из субпопуляции CD4^+ хелперных Т-клеток) или, как правило, не более чем 10^2 и не более 10^6 клеток, не более 10^8 включительно или 10^9 клеток, и может составлять более чем 10^{10} клеток. Количество клеток будет зависеть от требуемого использования, для которого предназначена композиция, и типа клеток, включенных в нее. Плотность требуемых клеток обычно превышает 10^6 клеток/мл и обычно превышает 10^7 клеток/мл, обычно 10^8 клеток/мл или больше. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть разделено на несколько инфузий, которые в совокупности равны или превышают 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} или 10^{12} клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения, в частности, поскольку все введенные в организм клетки будут перенаправлены на конкретный целевой антиген (DLL3), можно вводить меньшее количество клеток в диапазоне $10^6/\text{кг}$ (от 10^6 до 10^{11} на пациента). Лечение CAR можно вводить несколько раз в дозах, лежащих в этих пределах. Клетки могут быть аутологичными, аллогенными или гетерологичными для проходящего терапию пациента.

Популяции CAR-экспрессирующих клеток по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать популяцию клеток, экспрессирующих CAR или TCR, таких как Т-клетки, как описано в данном документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; вспомогательные вещества (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляют для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции (растворы, суспензии и т. п.) могут включать одно или несколько из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно-или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства, регулирующие тоничность, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения можно заключать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы с несколькими дозами, выполненные из стекла или пластика. Инъецируемая фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

Следует понимать, что нежелательные явления можно минимизировать путем трансдукции иммунных клеток (содержащих один или несколько CAR или TCR) геном "самоубийства". Также может быть желательным включить индуцируемый переключатель "включения" или "ускорения" в иммунные клетки. Подходящие методики включают использование индуцибельной каспазы-9 (заявка США 2011/0286980) или тимидинкиназы до, после или одновременно с трансдукцией клеток конструкцией CAR по настоящему изобретению. Дополнительные способы введения генов "самоубийства" и/или переключателей "включения" включают TALENS, цинковые пальцы, RNAi, siRNA, shRNA, антисмысловую технологию и другие способы, известные из уровня техники.

Следует понимать, что описания в данном документе являются лишь иллюстративными и пояснительными и не ограничивают заявленное изобретение. В данной заявке использование единственного числа включает множественное число, если конкретно не указано иное.

Используемые в данном документе заголовки разделов служат только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый объект изобретения. Все документы или части документов, цитируемые в данной заявке, включая без ограничения патенты, заявки на патенты, статьи, книги и трактаты, полностью включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме для любых целей. Используемые в соответствии с настоящим изобретением следующие термины, если не указано иное, должны иметь следующие значения.

В настоящей заявке использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включающий", а также других форм, таких как "включает" и "включенный", не является ограничивающим. Кроме того, такие термины как "элемент" или "компонент" охватывают как элементы и компоненты, содержащие одну единицу, так и элементы и компоненты, которые содержат более чем одну субъединицу, если конкретно не указано иное.

Термин "активность DLL3" включает любой биологический эффект DLL3. В некоторых вариантах осуществления активность DLL3 включает способность DLL3 взаимодействовать или связываться с субстратом или рецептором.

Термин "полинуклеотид", "нуклеотид" или "нуклеиновая кислота" включает как одонитевые, так и двухнитевые полимеры из нуклеотидов. Нуклеотиды, входящие в состав полинуклеотида, могут представлять собой рибонуклеотиды, или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Указанные модификации включают модификации оснований, такие как бромуридиновые и инозиновые производные, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, фосфороселеноатные, фосфородиселеноатные, фосфороанилотиоатные, фосфораниладатные и фосфорамидатные связи.

Термин "олигонуклеотид" относится к полинуклеотиду, содержащему 200 или меньше нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одонитевыми или двухнитевыми, например, для использования в конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды могут представлять собой смысловые или анти-смысловые олигонуклеотиды. Олигонуклеотид может содержать метку, включая радиоактивную метку, флуоресцентную метку, гаптен или антигенную метку для использования в анализах выявления. Олигонуклеотиды можно использовать, например, в качестве праймеров для ПЦР, праймеров для клонирования или гибридизационных зондов.

Термин "регуляторная последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, которая может воздействовать на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми она лигирована. Природа таких регуляторных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах осуществления регуляторные последовательности для прокариот могут включать промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. Например, регуляторные последовательности для эукариот могут включать промоторы, содержащие один или множество сайтов распознавания факторов транскрипции, последовательности энхансеров транскрипции и последовательность терминации транскрипции. "Регуляторные последовательности" могут включать в себя лидерные последовательности (сигнальные пептиды) и/или последовательности партнеров по слиянию.

Используемый в данном документе термин "функционально связанный" означает, что компоненты, в отношении которых используется данный термин, находятся во взаимосвязи, которая позволяет им

выполнять присущие им функции в подходящих условиях.

Термин "вектор" означает любую молекулу или структурную единицу (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), используемые для переноса белок-кодирующей информации в клетку-хозяина. Термин "вектор экспрессии" или "экспрессионная конструкция" относится к вектору, который подходит для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновой кислоты, которые направляют и/или регулируют (вместе с клеткой-хозяином) экспрессию одной или нескольких гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ними. Экспрессионная конструкция может включать без ограничения последовательности, которые оказывают влияние на транскрипцию, трансляцию или регулируют их и, при наличии интронов, оказывают влияние на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ними.

Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, которая была трансформирована или способна трансформироваться последовательностью нуклеиновой кислоты и вследствие этого экспрессирует представляющий интерес ген. Данный термин охватывает потомство родительской клетки вне зависимости от того, идентично ли данное потомство по морфологии или по генетической структуре исходной родительской клетке или нет, при условии, что присутствует представляющий интерес ген.

Термин "трансформация" относится к изменению генетических характеристик клетки, и при этом клетка была трансформирована, в случае если она была модифицирована с тем, чтобы она содержала новую ДНК или РНК. Например, клетка является трансформированной, когда она генетически модифицирована по сравнению с ее естественным состоянием путем введения нового генетического материала посредством трансфекции, трансдукции или других методик. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может подвергаться рекомбинации с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки, или может временно сохраняться в виде эписомального элемента без репликации, или может реплицироваться независимо в качестве плазмиды. Считается, что клетка является стабильно трансформированной, если трансформирующая ДНК реплицирована при делении клетки.

Термин "трансфекция" относится к поглощению клеткой чужеродной или экзогенной ДНК. Ряд методик трансфекции хорошо известен из уровня техники и раскрыт в данном документе. См., например, Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, выше; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu et al., 1981, *Gene* 13:197.

Термин "трансдукция" относится к способу, при котором чужеродную ДНК вводят в клетку посредством вирусного вектора. См. Jones et al., (1998). *Genetics: principles and analysis*. Boston: Jones & Bartlett Publ.

Термины "полипептид" или "белок" относятся к макромолекуле, имеющей аминокислотную последовательность белка, включая делеции, добавления и/или замены одной или нескольких аминокислот нативной последовательности. Термины "полипептид" и "белок", в частности, охватывают молекулы, связывающие антиген DLL3, антитела или последовательности, которые содержат делеции, добавления и/или замещения одной или нескольких аминокислот антигенсвязывающего белка. Термин "фрагмент полипептида" относится к полипептиду, который содержит аминоконцевую делецию, карбоксиконцевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным нативным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с нативным белком. Применимые фрагменты полипептида включают иммунологически функциональные фрагменты антигенсвязывающих молекул. Полезные фрагменты включают без ограничения одну или несколько CDR-областей, вариабельные домены тяжелой и/или легкой цепей, часть других частей цепи антитела и т. п.

Термин "выделенный" означает, что вещество (i) не содержит по меньшей мере некоторых других белков, с которыми оно в норме обнаруживалось бы, (ii) фактически не содержит других белков из того же источника, например, полученных от того же вида, (iii) отделено от по меньшей мере приблизительно 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которым оно ассоциировано в природе, (iv) функционально связано (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым оно не ассоциировано в природе, или (v) не встречается в природе.

"Вариант" полипептида (например, антигенсвязывающая молекула или антитело) содержит аминокислотную последовательность, где в данной аминокислотной последовательности один или несколько аминокислотных остатков вставлены, удалены и/или заменены по сравнению с другой полипептидной последовательностью. Варианты включают слитые белки.

Термин "идентичность" относится к сходству между последовательностями двух или более полипептидных молекул или двух или более молекул нуклеиновых кислот, как определено путем выравнивания и сравнения последовательностей. "Процент идентичности" означает процент идентичных остатков аминокислот или нуклеотидов у сравниваемых молекул, и его рассчитывают на основании размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для этих расчетов гэпы в выравниваниях (если таковые имеются) предпочтительно учтены с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т. е. "алгоритма").

Для расчета процента идентичности сравниваемые последовательности, как правило, выравнивают способом, который дает наибольшее совпадение между последовательностями. Одним примером компьютерной программы, которую можно использовать для определения процента идентичности, является

пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, Университет штата Висконсин, Мэдисон, Висконсин, США). Компьютерный алгоритм GAP применяют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых должен быть определен процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для получения оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов ("охват совпадения", определяемый алгоритмом). В определенных вариантах осуществления в данном алгоритме также используется стандартная матрица сравнения (см. Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62).

Как используется в данном документе, двадцать стандартных (например, встречающихся в природе) аминокислот и их сокращенные названия соответствуют общепринятой практике. См. Immunology - A Synthesis (2nd Edition, Golub and Gren, Eds., Sinauer Assoc, Sunderland, Mass. (1991)), которая включена в данный документ посредством ссылки для любой цели. Стереои́зомеры (например, D-аминокислоты) двадцати традиционных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как альфа-, альфа-дизамещенные аминокислоты, N-алкиламиноокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты также могут представлять собой подходящие компоненты для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры нестандартных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, гамма-карбоксихлутамат, эписилон-N,N,N-триметиллизин, ε-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, сигма-N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В системе обозначений полипептидов, используемой в данном документе, левым направлением является направление в сторону аминоконца, а правым направлением является направление в сторону карбоксильного конца в соответствии со стандартной практикой и правилами.

Консервативные аминокислотные замены могут охватывать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые, как правило, вводятся посредством химического пептидного синтеза, а не посредством синтеза в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных фрагментов. Встречающиеся в природе остатки можно разделить на классы на основе общих свойств боковой цепи:

- a) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c) кислотные: Asp, Glu;
- d) основные: His, Lys, Arg;
- e) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; а также
- f) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Например, неконсервативные замены могут включать замену представителя одного из этих классов на представителя другого класса. Такие замены остатков могут вводиться, например, в области человеческого антитела, которые гомологичны антителам, не являющимся человеческими, или в негомологичные области молекулы.

При внесении изменений в антигенсвязывающую молекулу, костимулирующие или активирующие домены сконструированной Т-клетки, в соответствии с определенными вариантами осуществления можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидрофобности на основании характеристик ее гидрофобности и заряда. Они являются следующими: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5). См. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Известно, что определенные аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты, характеризующиеся аналогичным индексом или показателем гидрофобности, и при этом белки сохраняют аналогичную биологическую активность. Также из уровня техники понятно, что замену подобных аминокислот можно эффективно осуществлять на основании гидрофильности, в частности, если созданный таким образом биологически функциональный белок или пептид предполагается использовать в иммунологических вариантах осуществления, как в случае настоящего изобретения. Иллюстративные аминокислотные замены изложены в табл. 2.

Таблица 2

<u>Исходные остатки</u>	<u>Иллюстративные замены</u>	<u>Предпочтительные замены</u>
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-диаминомасляная Кислота, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин	Leu

Термин "производное" относится к молекуле, которая включает в себя химическую модификацию, отличную от вставки, делеции или замены аминокислот (или нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах осуществления производные содержат ковалентные модификации, включая без ограничения химическое связывание с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная антигенсвязывающая молекула может иметь больший период полужизни в кровотоке, чем антигенсвязывающая молекула, которая не является химически модифицированной. В некоторых вариантах осуществления производная антигенсвязывающая молекула является ковалентно модифицированной с тем, чтобы включать одно или несколько водорастворимых полимерных присоединений, включая без ограничения полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль.

Аналоги пептидов обычно используются в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными свойствам исходного пептида. Эти типы не пептидных соединений называются "пептидными миметиками" или "пептидомиметиками". Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber & Freidinger, TINS, p.392 (1985); и Evans et al., J. Med. Chem., 30:1229 (1987), которые включены в данный документ посредством ссылки для любой цели.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству молекулы, связывающей антиген DLL3, которое, как определено, приводит к терапевтическому ответу у млекопитающего. Такие терапевтически эффективные количества могут быть легко установлены специалистом средней квалификации в данной области.

Термины "пациент" и "субъект" используются взаимозаменяемо и включают субъектов, представ-

ляющих собой людей и животных, отличных от человека, а также субъектов с официально диагностированными нарушениями, субъектов без официально признанных нарушений, субъектов, получающих медицинскую помощь, субъектов, подверженных риску развития нарушений, и т. д.

Термины "лечить" и "лечение" включают разновидности терапевтического лечения, разновидности профилактического лечения и пути применения, при которых снижается риск того, что у субъекта разовьется нарушение или другой фактор риска. Лечение не требует полного излечения нарушения и охватывает варианты осуществления, в которых уменьшают симптомы или лежащие в основе факторы риска. Термин "предотвратить" не требует 100% устранения возможности явления. Скорее это означает, что вероятность возникновения явления была снижена в присутствии соединения или способа.

Стандартные методы можно применять для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, а также для культивирования и трансформации тканей (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и методы очистки можно осуществлять в соответствии со спецификациями производителя, или как обычно осуществляется в данной области техники, или как описано в данном документе. Вышеуказанные методы и процедуры обычно можно осуществлять в соответствии с обычными способами, хорошо известными из уровня техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), которая включена в данный документ посредством ссылки для любой цели.

Настоящее изобретение будут дополнительно проиллюстрировано следующими последовательностями.

CD28T, ДНК, внеклеточный, трансмембранный, внутриклеточный домены
 CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGCA
 CCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCG
 TAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATC
 TTCTGGGTAGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGA
 CTCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAG
 AGATTTCGCTGCCTATCGGAGC (SEQ ID NO:1)

CD28T, внеклеточная, трансмембранная, внутриклеточная аминокислоты:
 LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP FWVLVVVGGV LACYSLLVTV
 AFIFWVRSK RSRLHSDYM NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAAYRS (SEQ ID
 NO:2)

CD28T, ДНК - внеклеточная
 CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGCA
 CCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA (SEQ ID NO:3)

CD28T, аминокислоты - внеклеточные
 LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP (SEQ ID NO:4)

CD28, ДНК, трансмембранный домен
 TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTACTCTCTGCTCG
 TCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT (SEQ ID NO:5)

CD28, аминокислоты, трансмембранный домен:
 FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIFWV (SEQ ID NO:6)

CD28, ДНК, внутриклеточный домен
 AGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCC
 ACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT
 TTCGCTGCCSTATCGGAGC (SEQ ID NO:7)

CD28, аминокислоты, внутриклеточный домен
 RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAAYRS (SEQ ID NO:8)

CD3-дзета, ДНК
 AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCA
 GAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTT
 GGACAAGCGCAGAGGACGGACCCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAA
 ACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCT
 ATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGT
 TTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGC
 AAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO:9)

CD3-дзета, аминокислоты

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR (SEQ ID NO:10)

CD28. ДНК

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGG
TACCATCATTCACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCTTCTCCCTCTTCCCCGGGC
CATCAAAGCCC (SEQ ID NO:11)

CD28, аминокислоты

IEVMYPPPYL DNEKSNGTII HVKKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO:12)

CD8, ДНК, внеклеточный и трансмембранный домены

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTG
TTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCAGCTCC
TACCATCGCTTCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGCA
GGGGGCGCTGTTCATACCAGAGGACTGGATTCGCTGCGATATCTATATCTGGG
CACCCCTGGCCGGAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTAT
TGTAATCACAGGAAC (SEQ ID NO:13)

CD8, аминокислоты, внеклеточный и трансмембранный домены

AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG

GAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:14)

4-1BB, ДНК, внутриклеточный домен

CGCTTTTCCGTCGTTAAGCGGGGAGAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAA
CAGCCGTTTATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCC
GCTTTCCTGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAAGT (SEQ ID NO:15)

4-1BB, аминокислоты, внутриклеточный домен

RFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID
NO:16)

Клон 1H2.1.HC. ДНК

CAGGTGCAACTGCAGGAAAGCGGGCCCGGTCTGGTGAAGCCCTCAGAAAC
GCTCTCCCTCACCTGTACAGTCTCTGGCGATTCAATCTCTTCATATTACTGGACGT
GGATCAGGCAGCCTCCCGCAAGGACTGGAGTGGATCGGATATATCTACTATA
GTGGCACCACCTAATAATCCTTCCCTGAAAAGCCGGGTGACAATCTCTGTTGA
CACCTCCAAGAGCCAGTTCAGCCTGAAACTCTCCAGTGTGACAGCCGCCGATACA
GCCGTGTACTACTGTGCCTCTATCGCTGTGCGCGGGTCTTTTTTGATTATTGGGG
CCAGGGGACACTGGTGACCGTTAGCAGC (SEQ ID NO:40)

Клон 1H2.1, HC, аминокислоты, CDR подчеркнуты

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSYYWTWIRQPPGKLEWIGYIYYS
GTTNYPNPSLKSRTISVDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCASIAVRGFFFDYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO:41)

Клон 1H2.1, HC, аминокислоты, CDR1:

SYWWT (SEQ ID NO:42)

Клон 1H2.1, HC, аминокислоты, CDR2:

YIYYSGTTNYPNPSLKS (SEQ ID

NO:43)

Клон 1H2.1, HC, аминокислоты, CDR3:

IAVRGFFFDY (SEQ ID NO:44)

Клон 1H2.1.LC, ДНК

GAAATTGTA CTGACCCAGTCCCCGGCACGCTCTCTCTCTCCCCAGGGGAA
 AGGGCAACCCTTAGCTGCCGGGCGAGCCAGAGCGTGAGTTCTCTACCTCGCGT
 GGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCTCCCAGACTGCTGATTTACGGGGCTTCTAC
 GAGAGCCACCGGCATACCTGATAGGTTCTCTGGCTCCGGGTCTGGGACCGACTTT
 ACTCTTACAATCAGCAGACTTGAGCCTGAAGACTTCGCTGTGTATTATTGTCAAC
 AATACGGAACGTCCCCCTTACCTTTGGTGGCGGGACAAAAGTGGAAATTAAGA
 GG (SEQ ID NO:45)

Клон 1H2.1, LC, аминокислоты (CDR подчеркнуты)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPLTFGGGTKVEIKR (SEQ
 ID NO:46)

Клон 1H2.1, LC, CDR1, аминокислоты:

RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:47)

Клон 1H2.1, LC, CDR2, аминокислоты:

GASTRAT (SEQ ID NO:48)

Клон 1H2.1, LC, CDR3, аминокислоты:

QQYGTSPLT (SEQ ID NO:49)

Клон 8D2, HC, ДНК

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTGCAAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGGTA CTATATGCACT
 GGGTTCGGCAGGCGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTTGGATTGATCCAA
 ACTCTGGCGATACAAATTACGCACAGAAATTCAGGGCCGCGTGACGATGACTCG
 AGACACTTCCATATCCACCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGAC
 ACTGCTGTCTATTACTGTGCAAGGGATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAA
 TGGATGTCTGGGCCCAGGGTACTACCGTCACGGTGTCTTCT (SEQ ID NO:50)

Клон 8D2, HC, аминокислоты (CDR подчеркнуты)

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMG
WIDPNSGDTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEVNRRLRSDDTAVYYCARDPNRRSW
YYGMDVWAQGTTTVTVSS (SEQ ID NO:51)

Клон 8D2, HC, аминокислоты, CDR1:

GYMH (SEQ ID NO:52)

Клон 8D2, HC, аминокислоты, CDR2:

WIDPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID

NO:53)

Клон 8D2, HC, аминокислоты, CDR3:

PNRRSWYYGMDV (SEQ ID NO:54)

Клон 8D2, LC, ДНК

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACGGCCGGGTGCAAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGGTA CTATATGCACT
 GGGTTCGGCAGGCGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTTGGATTGATCCAA
 ACTCTGGCGATACAAATTACGCACAGAAATTCAGGGCCGCGTGACGATGACTCG
 AGACACTTCCATATCCACCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTCCGGTCTGACGAC
 ACTGCTGTCTATTACTGTGCAAGGGATCCCAACCGGCGGAGTTGGTATTACGGAA
 TGGATGTCTGGGCCCAGGGTACTACCGTCACGGTGTCTTCTGGCGGCGGGGGCTC
 AGGAGGAGGAGGCAGCGGTGGAGGAGGCAGCGATATTCAGATGACACAAAGCC
 CTCTAGTCTCTCCGCAAGCGTTGGCGACCGCGTGACCATTACGTGTCAAGGCTTCA
 CAAGATATTCGAAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAAGCACCT
 AAGCTGCTGATTTATGACGCTAGCAACCTTGAGACTGGCGTCCCCTCCAGATTTTC
 CGGCAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACTTTTACCATCTCCACACTCCAGCCAGAA
 GATATTGCAACGTATTACTGCCAACATTATGATAACCTGCCTTTGACCTTCGGAG
 GTGGCACCAAGGTAGAGATCAGAAGA (SEQ ID NO:55)

Клон 8D2, LC, аминокислоты (CDR подчеркнуты)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN

LETGVPSRFSGSGTDFFTISTLQPEDIATYYCQHVDNLPLTFGGGTKVEIRR (SEQ

ID NO:56)

Клон 8D2, LC, аминокислоты, CDR1:

QASQDIRNYLN (SEQ ID NO:57)

Клон 8D2, LC, аминокислоты, CDR2:

DASNLET (SEQ ID NO:58)

Клон 8D2, LHC, аминокислоты, CDR3:

QHVDNLPLTF (SEQ ID NO:59)

Клон 6B2, HC, ДНК

CAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCAGGCGCTAG

CGTCAAAGTGAGCTGTAAGGCCCTCAGGTTACACGTTTACTGGTACTATATGCAT

TGGGTCAGGCAAGCCCCTGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCTGGATTAATCCTA

ACAGCGGGGACACAAGCTATGCCCAACGCTTCTGGGCAGAGTAACAATGACAC

GGGATACAAGTATTAACACCGTCCATATGGAACCTCTCGGCTCGGCTCAGATGA

TACCGCGGTTTATTACTGTGCTAGGGAGGACGACTCCTCTTGGTATGGCAGCTTC

GATTATTGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCATCT (SEQ ID NO:60)

Клон 6B2, HC, аминокислоты (CDR подчеркнуты)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMG

WINPNSGDTSYAQRFLGRVTMTRDTSINTVHMELSRGSDDTAVYYCAREDDSSWY

GSEFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:61)

Клон 6B2, HC, аминокислоты, CDR1: GYMH (SEQ ID NO: 62)

Клон 6B2, HC, аминокислоты, CDR2:

WINPNSGDTSYAQRFLG (SEQ ID

NO:63)

Клон 6B2, HC, аминокислоты, CDR3:

EDDSSWYGSEFDY (SEQ ID NO:64)

Клон 6B2, LC, ДНК

GATATACAGATGACTCAGAGTCCCTCAAGCTTGAGTGCCAGTGTAGGCGA

CCGGGTGACGATAACCTGTAGGGCTTCACAGGGAATCAGAAATTATCTGGGTTGG

TACCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCACCTAAAAGACTTATTTACGCCGCATCCTCCT

TGCAGTCCGGCGTGCCATCAAAATTTCTGGGAGCGGCTCTGGAACCGAGTTCAC

CCTCACGATCTCCAGCCTCCAGCCGAGGACTTTGCCACCTACTATTGCCTGCAGC

ACGATAGTGATCTGCGAACTTTGGGCAAGGCACTAAAGTGGAATTAAGAGA

(SEQ ID NO:65)

Клон 6B2, LC, аминокислоты (CDR подчеркнуты)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLGWYQQKPGKAPKRLIYAASS

LQSGVPSKFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHSDLRTEFGQGTKVEIKR (SEQ

ID NO:66)

Клон 6B2, LC, аминокислоты, CDR1:

RASQGIRNYLG (SEQ ID NO:67)

Клон 6B2, LC, аминокислоты, CDR2:

AASSLQS (SEQ ID NO:68)

Клон 6B2, LC, аминокислоты, CDR3:

LQHSDLRTEF (SEQ ID NO:69)

Конструкция 1H2.1 4-1BB, ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным)

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCGGTTGGCATTGCTCCTG
CACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAACTGCAGGAAAGCGGGCCCCGGTCTGGTGAA
GCCCTCAGAAACGCTCTCCCTCACCTGTACAGTCTCTGGCGATTCAATCTCTTCAT
ATTACTGGACGTGGATCAGGCAGCCTCCCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAT
ATATCTACTATAGTGGCACCCTAACTATAATCCTTCCCTGAAAAGCCGGGTGAC
AATCTCTGTTGACACCTCCAAGAGCCAGTTCAGCCTGAAACTCTCCAGTGTGACA
GCCGCCGATACAGCCGTGTATTACTGTGCCTCTATCGCTGTGCGCGGGTCTTTTT
TGATTATTGGGGCCAGGGGACACTGGTGACCGTTAGCAGCGGGGGAGGAGGGTC
CGGTGGCGGGCAGCGGAGGCGGGGGTTCAGAAATTGTAAGTACTGACCCAGTCCCC
CGGCACGCTCTCTCTCTCCCCAGGGGAAAGGGCAACCCTTAGCTGCCGGGCGAGC
CAGAGCGTGAGTTCCTCTACCTCGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCTC
CCAGACTGCTGATTTACGGGGCTTCTACGAGAGCCACCGGCATACCTGATAGGTT
CTCTGGCTCCGGGTCTGGGACCGACTTTACTCTTACAATCAGCAGACTTGAGCCT
GAAGACTTCGCTGTGTATTATTGTCAACAATACGGAACGTCCCCCTTACCTTTGG
TGGCGGGACAAAAGTGGAAATTAAGAGGGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTC
AAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTT
CCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTTCGATGTTGGTGGAGTCCCTCGCTTG
TTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTCGCTTTTCCGTCGT
TAAGCGGGGGAGAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTTTATGAGGCC
GGTCCAAACGACTCAGGAAGAAGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGGAGGA
GGAGGGCGGGTGCGAACTGAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGC
GTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGA
AGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAA
ACCAAGACGAAAAAACCCCGAGGAGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAA
GATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAA
AGGGCACGACGGTTTGTACCAGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGAC
GCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO:17)

Конструкция 1H2.1 4-IBB, аминокислоты (сигнальная последовательность выделена жирным; CDR подчеркнуты)

MALPVTALLLPLALLLHAARPVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSY
YWTWIRQPPGKLEWIGYIYSGTTNYPNPSLKSRTISVDTSKSKQFSLKLSVTAADT
AVYYCASIAVRGFFFDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTL
SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGG
TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGTSPFTFGGGTKVEIKRAALDNEKSNGTIIHVKGKHL
CPSPLFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRFVVKRGRKLLYIFKQP
FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRR
EEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:18)

Конструкция 1H2.1 CD28T, ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTG
CACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAACTGCAGGAAAGCGGGCCCCGGTCTGGTGAA
 GCCCTCAGAAACGCTCTCCCTCACCTGTACAGTCTCTGGCGATTCAATCTCTTCAT
 ATACTGGACGTGGATCAGGCAGCCTCCCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAT
 ATATCTACTATAGTGGCACCCTAACTATAATCCTTCCCTGAAAAGCCGGGTGAC
 AATCTCTGTTGACACCTCCAAGAGCCAGTTCAGCCTGAAACTCTCCAGTGTGACA
 GCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCTCTATCGCTGTGCGCGGGTTCTTTTT
 TGATTATTGGGGCCAGGGGACACTGGTGACCGTTAGCAGCGGGGGAGGAGGGTC
 CGGTGGCGGGCGGCAGCGGAGGGCGGGGGTTCAGAAATTGTAAGTACTGACCCAGTCCCC
 CGGCACGCTCTCTCTCTCCCCAGGGGAAAGGGCAACCCTTAGCTGCCGGGGCAGC
 CAGAGCGTGAGTTCCTCTACCTCGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCTC
 CCAGACTGCTGATTTACGGGGCTTCTACGAGAGCCACCGGCATACCTGATAGGTT
 CTCTGGCTCCGGGTCTGGGACCGACTTTACTCTTACAATCAGCAGACTTGAGCCT
 GAAGACTTCGCTGTGTATTATTGTCAACAATACGGAACGTCCCCCTTACCTTTGG
 TGCGGGGACAAAAGTGAAATTAAGAGGGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTC
 AAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTT
 CCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTTCGTAGTGGGTGGAGTCCCTCGCTTG
 TTAATCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTAGATCCAAAAGAA
 GCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCAC
 AAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGC
 CGAGTGAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCTATCAGCAGGGACAGAATC
 AACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACA
 AACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTC
 AAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTG
 AGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATC
 AGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCAC
 TGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO:19)

Конструкция 1H2.1 CD28T, аминокислоты (сигнальная последовательность выделена жирным; CDR подчеркнуты)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSY
 YWTWIRQPPGKLEWIGYIYYSGTTNYPNPSLKSRVTISVDTSKSKQFSLKLSVTAADT
 AVYYCASIAVRGFFFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLTSL
 PGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGTDF
 TLTISRLEPEDFAVYYCQYGTSPFTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHL
 CPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMPR
 RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG
 LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:20)

Конструкция 8D2 4-1BB, ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTG
CACGCCGCACGCCCGCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACG
 GCCGGGTGCAAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGG
 TACTATATGCACTGGGTTCGGCAGGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTT
 GGATTGATCCAAACTCTGGCGATACAAATTACGCACAGAAATTCAGGGCCGCGT
 GACGATGACTCGAGACACTTCCATATCCACCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTC
 CGGTCTGACGACACTGCTGTCTATTACTGTGCAAGGGATCCCAACCGGCGGAGTT
 GGTATTACGGAATGGATGTCTGGGCCAGGGTACTACCGTCACGGTGTCTTCTGG
 CGGCGGGGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGCGGTGGAGGAGGCAGCGATATTCAGA
 TGACACAAAGCCCTTCTAGTCTCTCCGCAAGCGTTGGCGACCGCGTGACCATTAC
 GTGTCAGGCTTCACAAGATATTCGAAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCC
 GGCAAAGCACCTAAGCTGCTGATTTATGACGCTAGCAACCTTGAGACTGGCGTCC
 CCTCCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACTTTTACCATCTCCACA
 CTCCAGCCAGAAGATATTGCAACGTATTACTGCCAACATTATGATAACCTGCCTT
 TGACCTTCGGAGGTGGCACCAAGGTAGAGATCAGAAGAGCCGCTGCCCTTGATA
 ATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGT
 CACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGA
 GTCCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTCCG
 TTTTCCGTCGTTAAGCGGGGAGAAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGT
 TTATGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAAGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTC
 TGAGGAGGAGGAGGGCGGGTGCAGAACTGAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGA
 TGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGG
 ACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGAT
 GGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCA
 GAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAG
 AAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGA
 TACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO:21)

Конструкция 8D2 4-1BB, аминокислоты (сигнальная последовательность выделена жирным)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKRPGASVKVVSCKASGYTFT
 GYYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGDTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEVN
 RLRSDDTAVYYCARDPNRRSWYYGMDVWAQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
 QMTQSPSSLSASVGRVITITCQASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYDASNLETGVP
 SRFSGSGSDFTFTISTLQPEDIATYYCQHYDNLPLTFGGGTKVEIRRAALDNEKSN
 GTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRFVSVKRG
 RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN
 QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
 GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:22)

Конструкция 8D2 CD28T, ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTG
CACGCCGCACGCCCGCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAACG
 GCCGGGTGCAAGCGTGAAGGTGCCTGCAAAGCCTCTGGCTATACCTTTACTGGG
 TACTATATGCACTGGGTTCGGCAGGCGCCAGGACAGGGTCTTGAGTGGATGGGTT
 GGATTGATCCAAACTCTGGCGATACAAATTACGCACAGAAATTCCAGGGCCGCGT
 GACGATGACTCGAGACACTTCCATATCCACCGCCTATATGGAAGTGAATAGACTC
 CGTCTGACGACACTGCTGTCTATTACTGTGCAAGGGATCCCAACCGGCGGAGTT
 GGTATTACGGAATGGATGTCTGGGCCAGGGTACTACCGTCACGGTGTCTTCTGG
 CGGCGGGGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGCGGTGGAGGAGGCAGCGATATTCAGA
 TGACACAAAGCCCTTCTAGTCTCTCCGCAAGCGTTGGCGACCGCGTGACCATTAC
 GTGTCAGGCTTACAAGATATTCGAAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCC
 GGCAAAGCACCTAAGCTGCTGATTTATGACGCTAGCAACCTTGAGACTGGCGTCC
 CCTCCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCAGGCACCGACTTTACTTTTACCATCTCCACA
 CTCCAGCCAGAAGATATTGCAACGTATTACTGCCAACATTATGATAACCTGCCTT
 TGACCTTCGGAGGTGGCACCAAGGTAGAGATCAGAAGAGCCGCTGCCCTTGATA
 ATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGT
 CACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGA
 GTCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTAGA
 TCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCC
 CTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGC
 CTATCGGAGCCGAGTGAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAG
 GGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTTCGAGAGAAGAGTACGAC
 GTTTTGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGG
 AAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAG
 GCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTACGAT
 GGCTTGATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACA
 TGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO:23)

Конструкция 8D2 CD28T, аминокислоты (сигнальная последовательность выделена жирным)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFT
 GYYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGDTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEVN
 RLRSDDTAVYYCARDPNRRSWYYGMDVWAQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI
 QMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVP
 SRFSGSGSGTDFFTISTLQPEDIATYYCQHYDNLPLTFGGGTKVEIRRAAALDNEKSN
 GTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLRH
 SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
 NLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:24)

Конструкция 6B2 CD28T, ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTG
CACGCCGCACGCCCGCAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAA
 ACCAGGCGCTAGCGTCAAAGTGAGCTGTAAGGCCTCAGGTTACACGTTTACTGGG
 TACTATATGCATTGGGTCAAGCAAGCCCCTGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCT
 GGATTAATCCTAACAGCGGGGACACAAGCTATGCCCAACGTTCTCTGGGCAGAGT
 AACAATGACACGGGATACAAGTATTAACACCGTCCATATGGAACTCTCTCGGCTC
 GGCTCAGATGATAACCGCGTTTATTACTGTGCTAGGGAGGACGACTCCTCTTGGT
 ATGGCAGCTTCGATTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGCAGTCTCATCTGGTGG
 AGGGGGCTCCGGGGTGGGGGCAGCGGAGGGGGAGGTTCTGATATACAGATGAC
 TCAGAGTCCCTCAAGCTTGAGTGCCAGTGTAGGCGACCGGGTGACGATAACCTGT
 AGGGCTTACAGGGAATCAGAAATTATCTGGGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGA
 AAGGCACCTAAAAGACTTATTTACGCCGCATCCTCCTTGCAGTCCGGCGTGCCAT
 CAAAATTTCTGGGAGCGGCTCTGGAACCGAGTTCACCCTCACGATCTCCAGCCT
 CCAGCCCGAGGACTTTGCCACCTACTATTGCCTGCAGCACGATAGTGATCTGCGA
 ACTTTTGGGCAAGGCACTAAAGTGAAAATTAAGAGAGCCGCTGCCCTTGATAATG
 AAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCAC
 CCTTGTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAAGTGGGTGGAGTC
 CTCGCTTGTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCC
 AAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTG
 GCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTA
 TCGGAGCCGAGTGAAAATTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGA
 CAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTT
 TGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAG
 AATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCG
 TACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTACCGATGGC
 TTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGC
 AGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO:25)

Конструкция 6B2 CD28T, аминокислоты (сигнальная последовательность выделена жирным)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKV**SCK**ASGYTFT
 GYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTSYAQRFLGRVTMTRDTSINTVH**MEL**SR
 LGSDDTAVYYCAREDDSSWYGSFDYWQGT**L**VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM
 TQSPSSLSASV**GRV**TITCRASQ**GIR**NYLGWYQ**QK**PGKAP**R**LIYAASSLQSGVPSKF
 S**GS**SGST**EFT**LTISS**LQ**PE**D**FATYYCLQ**I**DS**L**RT**F**G**Q**TK**VEI**KRAA**L**DNEK**S**NGTI
 IHVKGKHLCP**S**PL**F**PG**S**K**P**FWVLVVVGGVLACYSLLVTVA**F**I**F**WVR**S**K**R**S**R**LLHSD
 YMN**M**TPRR**P**GP**T**RKH**Y**Q**P**Y**A**PP**R**DF**A**Y**R**SR**V**K**F**SR**S**AD**A**P**A**Y**Q**Q**G**Q**N**Q**L**Y**N**EL**N**L
 GR**R**EEYD**V**LD**K**RR**R**GR**D**PE**M**GG**K**PR**R**KN**P**Q**E**GLY**N**EL**Q**K**D**K**M**AE**A**Y**S**E**I**GM**K**G**E**RR
 RGK**G**H**D**GLY**Q**GL**S**T**A**T**K**D**T**Y**D**AL**H**M**Q**AL**P**PR (SEQ ID NO:26)

Конструкция 6B2 4-1BB, ДНК (сигнальная последовательность выделена жирным)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTG
CACGCCGCACGCCCGCAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAA
 ACCAGGCGCTAGCGTCAAAGTGAGCTGTAAGGCCTCAGGTTACACGTTTACTGGG
 TACTATATGCATTGGGTCAAGCAAGCCCCTGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCT
 GGATTAATCCTAACAGCGGGGACACAAGCTATGCCCAACGTTCTCTGGGCAGAGT
 AACAATGACACGGGATACAAGTATTAACACCGTCCATATGGAACTCTCTCGGCTC
 GGCTCAGATGATAACCGCGTTTATTACTGTGCTAGGGAGGACGACTCCTCTTGGT

ATGGCAGCTTCGATTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCATCTGGTGG
 AGGGGGCTCCGGGGTGGGGGCAGCGGAGGGGGAGGTTCTGATATACAGATGAC
 TCAGAGTCCCTCAAGCTTGAGTGCCAGTGTAGGCGACCGGGTGACGATAACCTGT
 AGGGCTTACAGGGAATCAGAAATTATCTGGGTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGA
 AAGGCACCTAAAAGACTTATTTACGCCGCATCCTCCTGCAGTCCGGCGTGCCAT
 CAAAATTTCTGGGAGCGGCTCTGGAACCGAGTTCACCCTCACGATCTCCAGCCT
 CCAGCCCGAGGACTTTGCCACCTACTATTGCTGCAGCACGATAGTGATCTGCGA
 ACTTTTGGGCAAGGCACTAAAGTGAAAATTAAGAGAGCCGCTGCCCTTGATAATG
 AAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTAC
 CCTTGTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTC
 CTCGCTTGTACTCTCTGCTCGTACCGTGGCTTTTATAATCTCTGGGTTGCTTT
 TCCGTCGTTAAGCGGGGAGAAAAAGCTGCTGTACATTTTCAAACAGCCGTTTA
 TGAGGCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAAGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTCCTGA
 GGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAAGTGAAGTTTCCAGATCTGCAGATGC
 ACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTAACCTGGGACG
 CAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGG
 TGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAA
 GGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAG
 GGGAAAAGGGCACGACGGTTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATAC
 TTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEQ ID NO:27)

Конструкция 6B2 4-1BB, аминокислоты (сигнальная последовательность выделена жирным)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
 GYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTSYAQRFLGRVTMTRDTSINTVHMEISR
 LGSDDTAVYYCAREDDSSWYGSFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIQM
 TQSPSSLASVGDRTITCRASQIRNYLWYQQKPKGKAPKRLIYAASSLQSGVPSKF
 SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHDSLRITFGQGTKVEIKRAAALDNEKSNGTI
 IHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRFVVKRGRKK
 LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLY
 NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
 KGERRRGKGHGDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:28)

Изоформа 1 DLL3 человека, NM 016941, аминокислоты (618 аминокислот)

MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQHSFGPGPGAPRSPCSARLP
 CRLFFRVCLKPGLSEEAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFR
 DAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSSLARVAGRRLAAGGPWARDIQRAGAW
 LRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCPGLRPCAPLEDECEAPLVCRA
 GCSPEHGFCEQPGEERCLEGTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPG
 CDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGG
 ADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAG
 PRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPC
 AHGGRCYAHFSGLVCA CAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQR
 YLLPPALGLLVAAGVAGAALLVHVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDAL
 NNLRTQEGSGDGPSSVSDWNRPE DVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHT
 GRAGQRQHLLFPYPSSILSVK (SEQ ID NO:29)

Изоформа 2 DLL3 человека, NM_203486, аминокислоты (587 аминокислот)

MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARLP
 CRLFFRVCLKPLSEEAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFR
 DAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSSLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAW
 LRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCPGLRPCAPLEDECEAPLVCRA
 GCSPEHGFC EQPGECRCLEGTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGCDGNPCAN
 GGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPP
 GFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHLDLDDCAGRA
 CANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVCA
 CAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPLGLLVAAGVAGAAL
 LLVHVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNLRRTQEGSGDGPSSVDWNRPE
 DVDPQGIYVISAPSIYAREA (SEQ ID NO:30)

Сигнальный пептид CAR, ДНК

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCAC

GCCGCACGCCCG (SEQ ID NO:31)

Сигнальный пептид CAR:

MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:32)

scFv-линкер G4S, ДНК

GGCGGTGAGGCTCCGGAGGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTCC (SEQ

ID NO:33)

scFv-линкер G4S:

GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:34)

scFv-линкер Whitlow, ДНК

GGGTCTACATCCGCTCCGGAAGCCCGAAGTGGCGAAGGTAGTACAAA

GGGG (SEQ ID NO:35)

scFv-линкер Whitlow:

GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:36)

4-1BB, последовательность нуклеиновой кислоты (внутриклеточный домен)

AAGCGGGGAGAAAAAGCTGCTGTACATTTCAAACAGCCGTTTATGAG

GCCGGTCCAAACGACTCAGGAAGAAGACGGCTGCTCCTGCCGCTTTCCTGAGGAG

GAGGAGGGCGGGTGCGAACTG (SEQ ID NO:37)

4-1BB, аминокислоты (внутриклеточный домен)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:38)

OX40, аминокислоты

RRDQLPPDANKPPGGGSFRTPIQEEQADANSTLAKI (SEQ ID NO:39)

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки. Однако цитирование ссылки в данном документе не должно рассматриваться как подтверждение того, что такая ссылка является предшествующим уровнем техники для настоящего изобретения. В случае если любое из определений или терминов, представленных в ссылочных материалах, включенных в качестве ссылки, отличается от терминов и обсуждений, представленных в данном документе, преобладающими являются термины и определения согласно настоящему описанию.

Эквиваленты

Вышеизложенное письменное описание считается достаточным для того, чтобы дать возможность специалисту в данной области реализовать настоящее изобретение на практике. В вышеизложенном описании и примерах подробно описаны некоторые предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и описан наилучший способ, предусмотренный авторами настоящего изобретения. Однако следует иметь в виду, что независимо от того, насколько подробно вышеизложенное может появиться в тексте, настоящее изобретение может быть осуществлено с помощью многих способов, и при этом настоящее изобретение следует истолковывать в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые результаты, представлены лишь для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1.

Лентивирусный вектор переноса генов третьего поколения, содержащий различные конструкции CAR, использовали вместе с ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Life Technologies) для создания лентивирусных супернатантов. Вкратце, смесь для трансфекции получали путем смешивания 15 мкг ДНК и 22,5 мкл полиэтиленimina (Polysciences, 1 мг/мл) в 600 мкл среды OptiMEM. Смесь инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Одновременно с этим клетки 293Т (ATCC) обрабатывали трипсином, подсчитывали и в общей сложности 10×10^6 клеток высевали в колбу T75 вместе со смесью для трансфекции. Через три дня после трансфекции супернатанты собирали, фильтровали через фильтр 0,45 мкм и хранили при -80°C до использования. PBMC выделяли из лейкопаков здоровых доноров (Hemasare) с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколл-пака согласно инструкциям изготовителя. PBMC стимулировали с использованием ОКТ3 (50 нг/мл, Miltenyi Biotec) в среде R10 + IL-2 (300 МЕ/мл, Proleukin®, Prometheus®, Therapeutics and Diagnostics). Через сорок восемь часов после стимуляции клетки трансдуцировали с использованием лентивируса при MOI=10. Перед использованием в анализах активности клетки поддерживали при $0,5-2,0 \times 10^6$ клеток/мл. Для исследования экспрессии CAR Т-клетки окрашивали реагентом для выявления DLL3-Fc (Amgen, Inc.) или биотинилированным белком L (Thermo Scientific) в буфере для окрашивания (BD Pharmingen) в течение 30 минут при 4°C . Затем клетки промывали и окрашивали с помощью анти-Fc-PE (Miltenyi Biotec) или PE-стрептавидина (BD Pharmingen) в буфере для окрашивания в течение 30 минут при 4°C . Затем перед сбором данных клетки промывали и ресуспендировали в буфере для окрашивания с йодидом пропидия (BD Pharmingen). Экспрессия CAR к DLL3 в Т-клетках от здорового донора показана на фиг. 1. Цифры в каждом квадрате указывают процент положительной популяции.

Пример 2.

Для исследования цитолитической активности в трансдуцированных лентивирусом Т-клетках с CAR к DLL3 эффекторные клетки культивировали с клетками-мишенями при соотношении E:T, составляющем 1:1, в среде R10. Через шестнадцать и сорок часов после совместного культивирования супернатанты анализировали с помощью Luminex (EMD Millipore) и жизнеспособность клеток-мишеней оценивали с помощью анализа методом проточной цитометрии поглощения йодида пропидия (PI) CD3-отрицательными клетками. Средняя цитолитическая активность трансдуцированных лентивирусом Т-клеток с CAR от здоровых доноров показана на фиг. 2 (клетки EoL1 являются контрольными, H82 и EoL1-DLL3 экспрессируют DLL3 на поверхности), а продукция цитокинов Т-клетками с CAR от здорового донора показана на фиг. 3.

Пример 3.

Для оценки пролиферации Т-клеток с CAR в ответ на клетки-мишени, экспрессирующие DLL3, Т-клетки метили с помощью CFSE перед совместным культивированием с клетками-мишенями при соотношении E:T, составляющем 1:1, в среде R10. Через пять дней пролиферацию Т-клеток оценивали с помощью анализа методом проточной цитометрии разбавления CFSE (фиг. 4). Пролiferация Т-клеток с CAR к DLL3 показана на фиг. 5.

Пример 4.

Для исследования противоопухолевой активности *in vivo* создавали Т-клетки с CAR к DLL3 для использования в ксеногенной модели SCLC человека. Меченые люциферазой клетки SHP-77 (2×10^6 /животное) вводили внутривенно самкам мышей NSG в возрасте от 5 до 6 недель. Через 6 дней 6×10^6 Т-клеток ($\sim 50\%$ CAR+) в 200 мкл PBS инъецировали внутривенно и еженедельно измеряли опухолевую нагрузку у животных с использованием биолюминесцентной визуализации. Как показано на фиг. 6, инъекция Т-клеток с CAR к DLL3 значительно снижала опухолевую нагрузку во все исследованные моменты времени (nt = нетрансфицированный контроль; CAR1 = 1H2.1-C28T-CD28-CD3 ζ ; CAR2 = 1H2.1-C28T-4-1BB-CD3 ζ ; CAR3 = 1H2.1-C8k-CD28-CD3 ζ ; CAR4 = 1H2.1-C8k-4-1BB-CD3 ζ). Как показано на фиг. 6, это было дополнительно подтверждено анализом выживаемости, в котором инъекция экспрессирующих Т-клеток с CAR 1H2-CD28T или 1H2-4-1BB давала значительное преимущество в выживаемости по сравнению с животными, которым вводили клетки с имитацией трансдукции.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор, содержащий

(i) антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с DLL3, костимулирующий домен, и активирующий домен, представляющий собой сигнальную область CD3-дзета, где антигенсвязывающая молекула содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области (CDR) 1, 2 и 3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 соответственно, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 49 соответственно; или

б) VH область и VL область, выбранную из следующих:

(1) VH область SEQ ID NO: 41 и VL область SEQ ID NO: 46; или

(2) VH область, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41, и VL область, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46, при условии, что VH область содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 42, CDR2 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 44, и VL область содержит CDR1 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 47, CDR2 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 48 и CDR3 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 49;

и по меньшей мере один костимулирующий домен, где костимулирующий домен представляет собой костимулирующий домен CD28, который содержит последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 4 в комбинации с SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8, или костимулирующий домен 4-1BB, который содержит последовательность SEQ ID NO: 16.

2. Химерный антигенный рецептор по п.1, где CD3-дзета содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

3. Полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор по п.1.

4. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.3, который представляет собой ретровирусный вектор, ДНК-вектор, плазмиду, РНК-вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса, лентивирусный вектор или любую их комбинацию.

5. Иммунная клетка, содержащая вектор по п.4, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, лимфоцит, инфильтрирующий опухоль (TIL), NK-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или NK-Т-клетку.

6. Иммунная клетка по п.5, где клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.

7. Иммунная клетка по п.5, где клетка представляет собой аллогенную Т-клетку.

8. Иммунная клетка по п.5, где вектор вводится в клетку, выделенную из организма пациента или выращенную из образца, взятого из организма пациента.

9. Иммунная клетка по п.5, где вектор вводится в клетку, выделенную из организма донора или выращенную из образца, взятого из организма пациента.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку по п.5.

11. Химерный антигенный рецептор по п.1, где VH и VL области связаны по меньшей мере одним линкером, при этом линкер предусматривает scFv-линкер G4S или scFv-линкер Whitlow.

12. Выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

13. Выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается с DLL3, где полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 19.

14. Полинуклеотид по п.13, дополнительно кодирующий активирующий домен, где активирующий домен представляет собой CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

15. Полинуклеотид по п.13, дополнительно кодирующий костимулирующий домен CD28T, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

16. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.13.

17. Выделенная иммунная клетка, содержащая вектор по п.16, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, лимфоцит, инфильтрирующий опухоль (TIL), NK-клетку, TCR-экспрессирующую клетку, дендритную клетку или NK-Т-клетку.

18. Применение полинуклеотида по п.3 или 13, полипептида по п.12, химерного антигенного рецептора по п.1, клетки по п.5 или фармацевтической композиции по п.10 в лечении заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта.

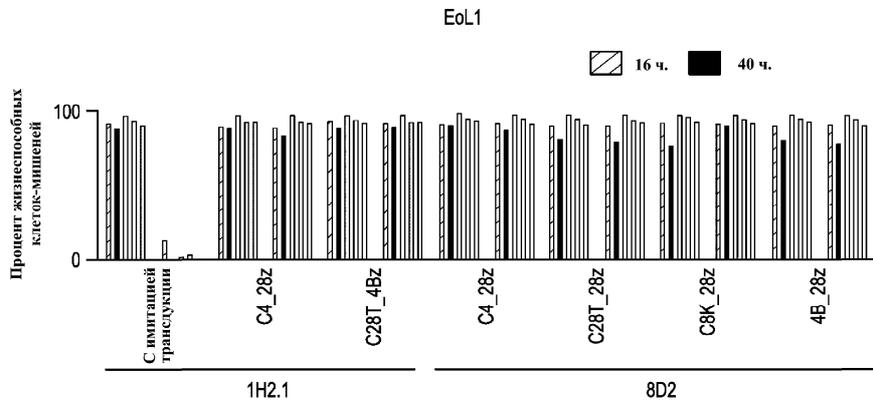
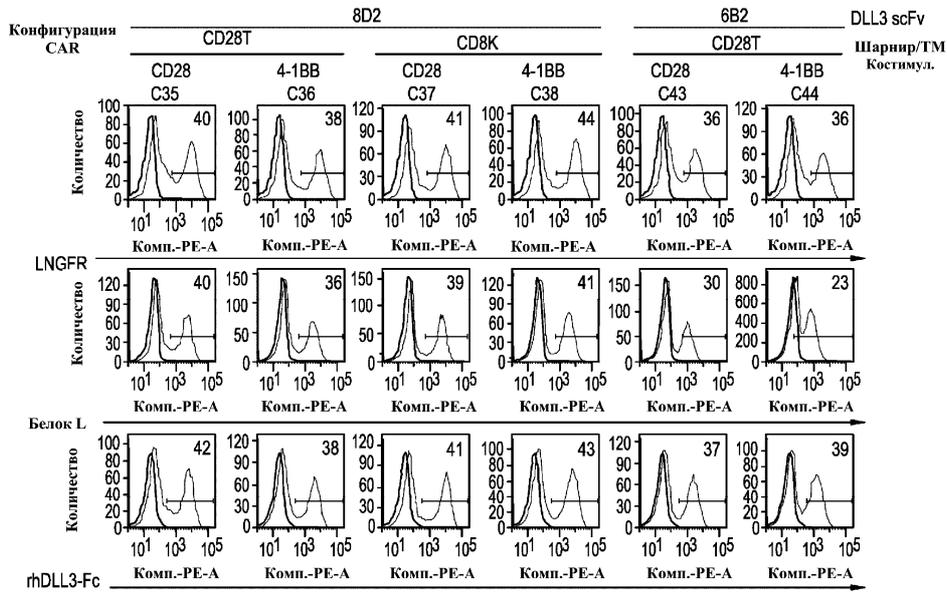
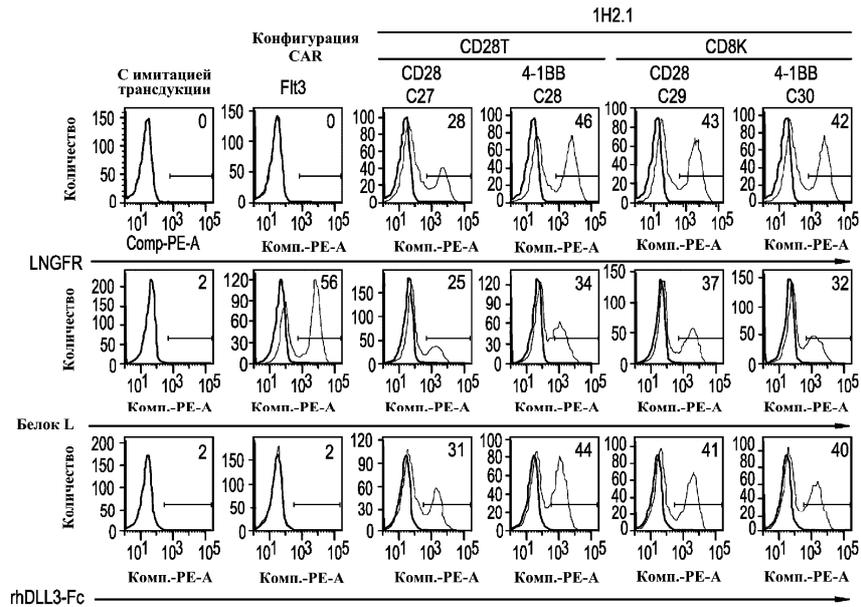
19. Применение полинуклеотида по п.3 или 13, полипептида по п.12, химерного антигенного рецептора по п.1, клетки по п.5 или фармацевтической композиции по п.10 для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта.

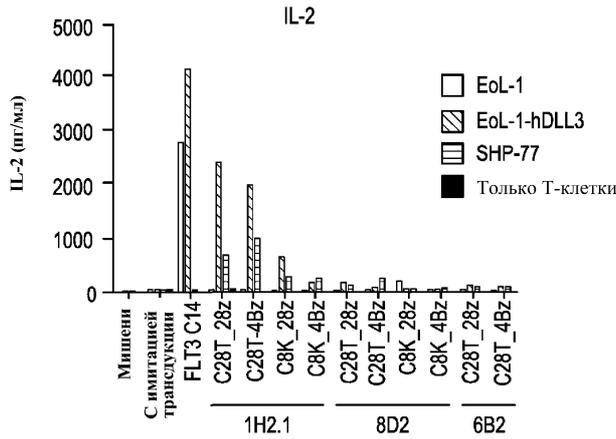
20. Применение по п.18 или 19, где заболевание или нарушение представляет собой рак.

21. Применение по п.20, где рак представляет собой рак надпочечника, печени, почки, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, яичника, шейки матки, матки, пищевода, колоректальный рак, рак предстательной железы (например, аденокарциному предстательной железы), поджелудочной железы, легкого (как мелкоклеточный, так и немелкоклеточный), щитовидной железы, виды карциномы, саркомы, глиобластомы, опухоли головы и шеи, крупноклеточную нейроэндокринную карциному (LCNEC), медуллярный рак щитовидной железы, глиобластому, нейроэндокринный рак предстательной железы (NEPC), высокозлокачественный рак желудочно-кишечного тракта или поджелудочной железы (GEP) и злокачественную меланому.

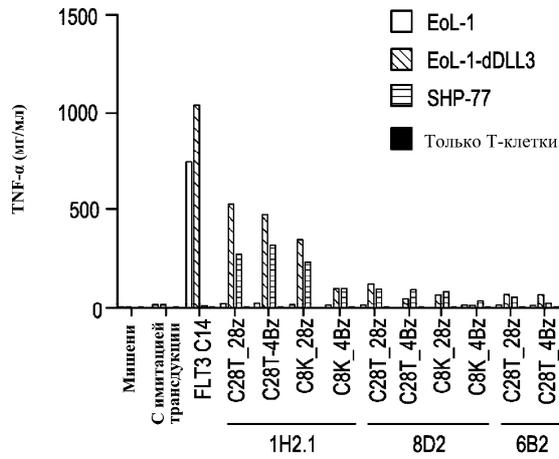
22. Применение по п.21, где рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

23. Вектор по п.4, где вектор представляет собой лентивирусный вектор, являющийся вектором pGAR.

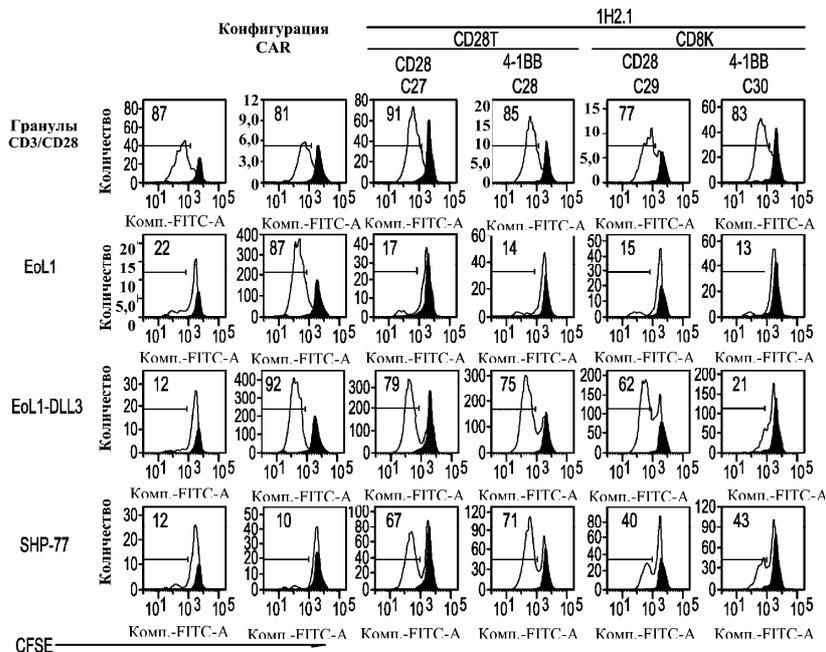




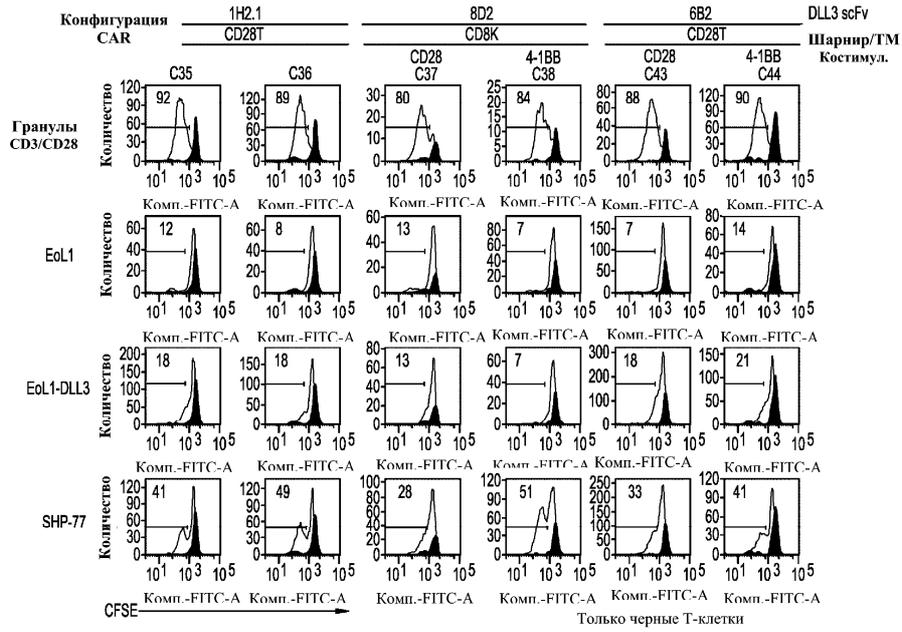
Фиг. 3В



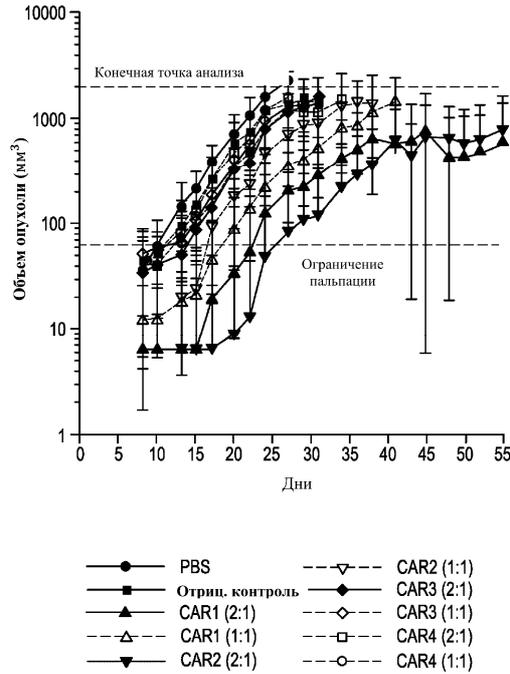
Фиг. 3С



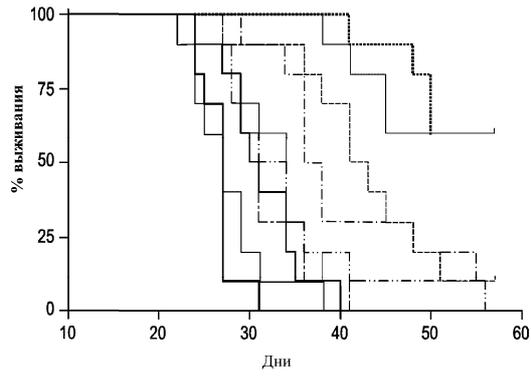
Фиг. 4А



Фиг. 4В

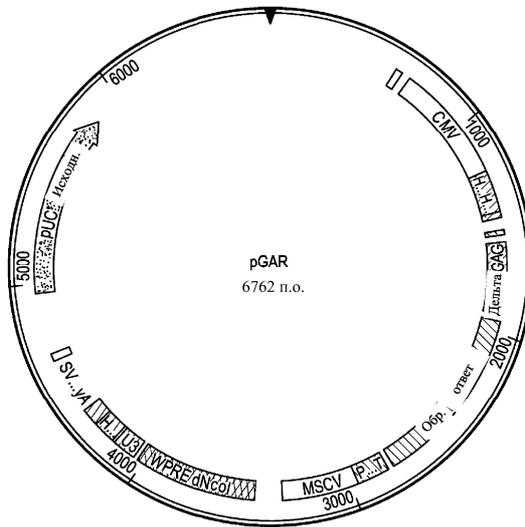


Фиг. 5



- PBS
- Отриц. контроль
- CAR1 (2:1)
- CAR1 (1:1)
- CAR2 (2:1)
- CAR2 (1:1)
- CAR3 (2:1)
- CAR3 (1:1)
- CAR4 (2:1)
- CAR4 (1:1)

Фиг. 6



Фиг. 7