

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490664** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.08.06

(22) Дата подачи заявки
2022.10.18

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) **СИГНАЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ ДЛЯ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

(31) **63/256,956**

(32) **2021.10.18**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/078283**

(87) **WO 2023/069936 2023.04.27**

(71) Заявитель:
КАЙТ ФАРМА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Айвар Рикардо, Фэн Цзюнь, Гевара
Клаудия И., Мураками Джоди,
Новихед Хеба Н., Уайман Сара К. (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Описаны химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен; костимулирующий домен; и сигнальный домен, содержащий один из сигнального домена CD3ε, сигнального домена CD3γ, сигнального домена CD3δ или сигнального домена DAP12. Описана нуклеиновая кислота, кодирующая CAR и рекомбинантный вектор, содержащий такие нуклеиновые кислоты. Описана клетка-хозяин, содержащая такие нуклеиновые кислоты и рекомбинантные векторы, и фармацевтическая композиция, содержащая такие клетки-хозяева. Описан способ лечения заболевания у пациента, нуждающегося в этом, или индуцирования иммунного ответа у субъекта, или иммунизации субъекта против рака.

FMCS3 sFc	ШАРНИРНЫЙ ДОМЕН CD28T	CD28 TM	CD28 CD-STIM	β2M	T2A	CD28 CAR
FMCS3 sFc	ШАРНИРНЫЙ ДОМЕН CD28T	CD28 TM	CD28 CD-STIM	ЭПСИЛОН-CD3	T2A	CD28 CAR
FMCS3 sFc	ШАРНИРНЫЙ ДОМЕН CD28T	CD28 TM	CD28 CD-STIM	ЭПСИЛОН-CD3 (A181-185)	T2A	CD28 CAR
FMCS3 sFc	ШАРНИРНЫЙ ДОМЕН CD28T	CD28 TM	CD28 CD-STIM	ЭПСИЛОН-CD3 (R183K)	T2A	CD28 CAR
FMCS3 sFc	ШАРНИРНЫЙ ДОМЕН CD28T	CD28 TM	CD28 CD-STIM	ЭПСИЛОН-CD3 (S178N/R183K)	T2A	CD28 CAR

A1

202490664

202490664

A1

СИГНАЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ ДЛЯ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета согласно предварительной заявке на патент США № 63/256 956, поданной 18 октября 2021 г. под названием “Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy”, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к области клеточной терапии и, более конкретно, к клеточной терапии химерным антигенным рецептором (CAR).

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Злокачественные опухоли человека по своей природе состоят из нормальных клеток, которые подверглись генетическому или эпигенетическому преобразованию, превратившись в аномальные раковые клетки. При этом раковые клетки начинают экспрессировать белки и другие антигены, которые отличаются от экспрессируемых нормальными клетками. Эти aberrantные опухолевые антигены могут быть использованы врожденной иммунной системой организма для специфического нацеливания и уничтожения раковых клеток. Однако раковые клетки используют различные механизмы для предупреждения успешного нацеливания на раковые клетки иммунных клеток, таких как Т- и В-лимфоциты.

[0004] Современные виды терапии на основе Т-клеток основаны на обогащенных или модифицированных Т-клетках человека для нацеливания и уничтожения раковых клеток у пациента. Чтобы повысить способность Т-клеток нацеливаться на конкретную раковую клетку и уничтожать ее, были разработаны способы конструирования Т-клеток для экспрессии конструктов, которые нацеливают Т-клетки на конкретную раковую клетку-мишень. Химерные антигенные рецепторы (CAR), которые содержат связывающие домены, способные взаимодействовать с конкретным опухолевым антигеном, позволяют Т-клеткам нацеливаться на раковые клетки, которые экспрессируют конкретный опухолевый антиген, и уничтожать их.

[0005] Существует потребность в улучшенных способах получения Т-клеток, модифицированных антигенным рецептором, для специфического нацеливания и уничтожения раковых клеток в аутологичных или аллогенных условиях.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Описаны химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен; костимулирующий домен; и сигнальный домен, содержащий один из сигнального домена CD3 ϵ , сигнального домена CD3 γ , сигнального домена CD3 δ или сигнального домена DAP-12.

[0007] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит анти-CD19 связывающий домен, имеющий определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3; и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 2–4; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 5–7; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 8–10; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 12–14; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 15–17; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 18–20.

[0008] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит анти-CD19 связывающий домен, имеющий HCDR1, HCDR2 и HCDR3; LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 24–26; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 27–29; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 30–32; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 34–36; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 37–39; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 40–42.

[0009] В вариантах осуществления CAR содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, HCDR2, и HCDR3; и первый переменный домен легкой цепи, содержащий LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем переменный домен тяжелой цепи на по меньшей мере 80% идентичен SEQ ID NO: 1; и переменный домен легкой цепи на по меньшей мере 80% идентичен SEQ ID NO: 11 или переменный домен тяжелой цепи на по меньшей мере 80% идентичен SEQ ID NO: 24; и переменный домен легкой цепи на по меньшей мере 80% идентичен SEQ ID NO: 33.

[0010] В вариантах осуществления HCDR1, HCDR2, HCDR3; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 состоят из одного полипептида.

[0011] В вариантах осуществления анти-CD19 связывающий домен содержит scFv. В вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность в соответствии с одной из SEQ ID NO: 21 или 43.

[0012] В вариантах осуществления сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3ε с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89. В вариантах осуществления сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3γ с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 57. В вариантах осуществления сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3δ с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 55. В вариантах осуществления сигнальный домен содержит сигнальный домен DAP-12 с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 59.

[0013] В вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28. В вариантах осуществления костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28.

[0014] В вариантах осуществления анти-CD19 CAR содержит аминокислотную последовательность в соответствии с одной из SEQ ID NO: 62, 65, 67 и 69.

[0015] В данном описании представлена нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, описанный в настоящем документе. В данном описании представлен рекомбинантный вектор, содержащий такие нуклеиновые кислоты. В данном описании представлена клетка-хозяин, трансформированная такими нуклеиновыми кислотами и рекомбинантными векторами. В вариантах осуществления клетка-хозяин содержит Т-клетку, инвариантную естественную киллерную Т-клетку (iNKT-клетка) или естественную клетку-киллера (NK-клетка).

[0016] В данном описании представлена фармацевтическая композиция, содержащая такие Т-клетки, iNKT-клетки или NK-клетки. В данном описании представлен способ лечения заболевания у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту Т-клетки, iNKT-клетки и/или NK-клетки или фармацевтической композиции. В данном описании представлен способ индуцирования иммунного ответа у субъекта или иммунизации субъекта против гепатоцеллюлярной карциномы, который включает введение субъекту Т-клетки и/или NK-клетки или фармацевтической композиции. В вариантах осуществления рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) (включая не-Т-клеточный ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз (В-ОЛЛ), бластное новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический миелоидный лейкоз, хронический

или острый лейкоз, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), волосатоклеточный лейкоз, болезнь Ходжкина, злокачественные лимфопролиферативные заболевания, лимфому MALT-типа, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, моноклональную гаммапатию неопределенного значения (МГНЗ), множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому (НХЛ), пролиферативное заболевание плазматических клеток (включая бессимптомную миелому (тлеющую множественную миелому), плазмобластную лимфому, новообразование из плазмцитоподобных дендритных клеток, плазмцитому (включая плазмклеточную дискразию; солитарную миелому; солитарную плазмцитому; экстрамедуллярную плазмцитому; и множественные плазмцитомы), РОЕМС-синдром (также известный как синдром Кроу-Фукаса; болезнь Такатсуки; и РЕР-синдром), первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (PMBC), мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), системный амилоидоз легкой цепи амилоидного белка, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз (Т-ОЛЛ), Т-клеточную лимфому, трансформированную фолликулярную лимфому или макроглобулинемию Вальденстрема, мантийноклеточную лимфому (МКЛ), трансформированную фолликулярную лимфому (ТФЛ), первичную медиастинальную В-клеточную лимфому (PMBCL), множественную миелому, волосатоклеточную лимфому/лейкоз или их комбинацию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0017] На Фиг. 1 проиллюстрированы варианты осуществления анти-CD19 CAR с сигнальным доменом, выбранным из группы, состоящей из CD3-дзета, кодон-оптимизированного CD3-эпсилон, кодон-оптимизированного эпсилон ($\Delta 181-185$), кодон-оптимизированного эпсилон (R183K) и кодон-оптимизированного эпсилон (S178N.R183K) в бицистронном формате с CAR CD3-дзета CD20 (CD20z) второго поколения.

[0018] На Фиг. 2 представлены варианты осуществления анти-CD19 CAR с сигнальным доменом, выбранным из группы, состоящей из кодон-оптимизированного эпсилон ($\Delta 181-185$), кодон-оптимизированного эпсилон (R183K) и кодон-оптимизированного эпсилон (S178N.R183K).

[0019] На Фиг. 3 представлены варианты осуществления анти-CD19 CAR с сигнальным доменом, выбранным из группы, состоящей из дзета, дзета 1xx, эпсилон, дельта, гамма, Dap12, кодон-оптимизированного дзета и кодон-оптимизированного эпсилон.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Термины

[0020] Для лучшего понимания настоящего описания ниже приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов изложены в тексте описания.

[0021] В настоящем описании и в приложенных пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают обозначения множественного числа, если иное четко не следует из контекста.

[0022] Если специально не указано или не очевидно из контекста, в данном документе термин «или» следует понимать как включающий и он охватывает как «или», так и «и».

[0023] Термин «и/или», используемый в настоящем документе, следует понимать как конкретное описание каждого из двух указанных характеристик или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин «и/или» в контексте такой фразы, как «А и/или В», в настоящем документе предназначен для включения А и В; А или В; А (отдельно); и В (отдельно). Аналогичным образом, термин «и/или», используемый в фразе, такой как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0024] Термины «например» в контексте настоящего документа используются исключительно в качестве примера, без ограничений, и не должны рассматриваться как относящиеся только к тем элементам, которые явно перечислены в описании.

[0025] Термины «или более», «по меньшей мере», «более чем» и т. п., например «по меньшей мере один», включают, без ограничения, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 или 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или больше, чем указанное значение. Также включено любое большее количество или доля между ними.

[0026] И наоборот, термин «не более чем» включает в себя каждое значение, меньшее, чем указанное значение. Например, «не более чем 100 нуклеотидов» включает в себя 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47,

46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и 0 нуклеотидов. Также включено любое меньшее количество или доля между ними.

[0027] Термины «множество», «по меньшей мере два», «два или более», «по меньшей мере второй» и т. п. включают в себя, без ограничения, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 или 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или больше. Также включено любое большее количество или доля между ними.

[0028] Следует понимать, что в тексте описания слово «содержащий» или варианты, такие как «содержит» или «который содержит», будут подразумевать включение указанного элемента, целого числа или шага или группы элементов, целых чисел или шагов, но не исключение любого другого элемента, целого числа или шага или группы элементов, целых чисел или шагов. Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», в противном случае также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по сути из».

[0029] Если специально не указано или не очевидно из контекста, термин «приблизительно» относится к значению или составу, которые находятся в пределах допустимого диапазона ошибки для конкретного значения или состава, как определено специалистом в данной области, что будет частично зависеть от того, как значение или состав измеряется или определяется, т. е. ограничений системы измерения. Например, «приблизительно» или «содержащий по сути» может означать в пределах одного или более одного стандартного отклонения при практическом применении в данной области. Термины «приблизительно» или «содержащий по сути» могут означать диапазон до 10% (т. е. $\pm 10\%$). Таким образом, термин «приблизительно» можно понимать как в пределах больше или меньше 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% или 0,001% от указанного значения. Например, приблизительно 5 мг может включать любое количество от 4,5 мг до 5,5 мг. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов термины могут означать до порядка величины или до 5-кратного значения. Если определенные значения или композиции приведены в настоящем описании, если не указано иное, следует считать, что значение терминов «приблизительно» или

«содержащий по сути» должно находиться в пределах приемлемого диапазона ошибок для этого определенного значения или состава.

[0030] В контексте настоящего документа любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одной десятой и одной сотой части целого числа), если не указано иное.

[0031] Единицы, префиксы и символы в контексте настоящего документа приведены в их общепринятой форме Международной системы единиц измерения (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон.

[0032] Все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, если не дано иное их определение, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области, к которой имеет отношение настоящее изобретение. Например, Juo, “The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology”, 2nd ed., (2001), CRC Press; “The Dictionary of Cell & Molecular Biology”, 5th ed., (2013), Academic Press; и “The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology”, Cammack *et al.* eds., 2nd ed, (2006), Oxford University Press предоставляют специалистам в данной области общий словарь многих терминов, используемых в настоящем описании.

[0033] Термин «введение» относится к физическому введению субъекту агента, такого как сконструированная Т-клетка, описанная в настоящем документе, с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Иллюстративные пути введения составов, описанных в настоящем документе, включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение» означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, но не ограничиваются ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастермальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления состав вводят непарентеральным путем, например перорально. Другие непарентеральные пути включают местное, эпидермальное или мукозальное введение, например интраназально, вагинально,

ректально, сублингвально или местно. Введение можно осуществлять, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или более длительных периодов времени.

[0034] Термины «активированный» и «активация» относятся к состоянию Т-клетки, которая была достаточно стимулирована для индуцирования обнаруживаемой клеточной пролиферации. В одном варианте осуществления активация может быть ассоциирована с индуцированным продуцированием цитокинов и обнаруживаемыми эффекторными функциями. Термин «активированные Т-клетки» относится, помимо прочего, к Т-клеткам, которые пролиферируют. Сигналы, генерируемые только TCR, могут быть недостаточными для полной активации Т-клетки, поэтому может потребоваться один или более вторичных или костимулирующих сигналов. Таким образом, активация Т-клеток включает в себя первичный стимулирующий сигнал через комплекс TCR/CD3 и один или более вторичных костимулирующих сигналов. Костимуляция может проявляться пролиферацией и/или выработкой цитокинов Т-клетками, которые получили первичный сигнал активации, такой как стимуляция через комплекс TCR/CD3.

[0035] Термин «агент» может относиться к молекуле или элементу любого класса, включающему, или к множеству молекул или элементов, любой из которых может представлять собой, например, полипептид, нуклеиновую кислоту, сахарид, липид, малую молекулу, металл, клетку (например, Т-клетку или предшественник таких клеток) или организм (например, его фракцию или экстракт) или их компонент. В некоторых вариантах осуществления агент может быть использован в выделенной или чистой форме. В некоторых вариантах осуществления агент может быть использован в необработанной или неочищенной форме. В некоторых вариантах осуществления агент может быть представлен в виде популяции, коллекции или библиотеки, например, которая может быть подвергнута скринингу для идентификации или определения характеристик присутствующих в ней членов.

[0036] Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от одного индивидуума, который затем вводят другому индивидууму того же вида, например, аллогенная Т-клеточная трансплантация.

[0037] Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от того же субъекта, которому он позднее должен быть повторно введен. Например, способ терапии на основе сконструированных аутологичных клеток, описанный в настоящем документе, включает сбор лимфоцитов у пациента, которые затем конструируют для экспрессии, например, конструкта CAR, а затем вводят обратно тому же пациенту.

[0038] Термин «антитело» (Ab) включает, без ограничения, гликопротеиновый иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном. Как правило, антитело

может содержать по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающие молекулы. Каждая цепь H содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно описанную в данном документе как VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три константных домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно описанную в данном документе как VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один константный домен: CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гиперпеременности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL содержат три CDR и четыре FR, расположенные от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. В целом, человеческие антитела представляют собой тетрамерные агенты с массой около 150 кД, состоящие из двух идентичных полипептидов тяжелой (H) цепи (около 50 кД каждый) и двух идентичных полипептидов легкой (L) цепи (около 25 кД каждый), которые соединяются друг с другом в структуру, которую принято называть «Y-образной». Тяжелые и легкие цепи связаны или соединены друг с другом одной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелой цепи друг с другом, так что димеры соединяются друг с другом, и образуется тетрамер. Антитела естественного происхождения также гликозилированы, например, на домене CH2.

[0039] Термин «человеческое антитело» предназначен для обозначения антител, имеющих переменные и константные доменные последовательности, созданные, собранные или полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека или последовательностей, неотличимых от них. В некоторых вариантах осуществления антитела (или компоненты антител) могут считаться «человеческими», даже если их аминокислотные последовательности содержат остатки или элементы, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, вариации, введенные в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или введенные в результате соматической мутации *in vivo*). Термин «гуманизированные»

предназначен для обозначения антител, имеющих переменный домен с последовательностью, полученной из переменного домена нечеловеческого вида (например, мыши), модифицированной таким образом, чтобы быть более похожей на последовательность, кодируемую зародышевой линией человека. В некоторых вариантах осуществления «гуманизованное» антитело содержит один или несколько каркасных доменов, имеющих по существу аминокислотную последовательность каркасного домена человека, и одну или несколько определяющих комплементарность областей, имеющих по существу ту же аминокислотную последовательность, что и у антитела, не относящегося к человеческому. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело содержит по меньшей мере фрагмент константной области иммуноглобулина (Fc), обычно константного домена иммуноглобулина человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела могут содержать шарнирную область C_H1, C_H2, C_H3 и, необязательно, C_H4 константного домена тяжелой цепи человека.

[0040] Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, сконструированные антитела, гуманизованные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела, интратела, слитые антитела (иногда упоминаемые в настоящем документе как «конъюгаты антител»), гетероконъюгаты антител, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fvs (scFv), верблюдообразные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, фрагменты F(ab')₂, дисульфидно-связанные Fvs (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела), минитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в настоящем документе «миметики антител») и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленного. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела также могут содержать, например, Fab'-фрагменты, Fd'-фрагменты, Fd-фрагменты, выделенные CDR, одноцепочечные Fv, слитые белки полипептид-Fc, однодоменные антитела (например, однодоменные антитела акулы, такие как IgNAR или их фрагменты), антитела верблюдовых, одноцепочечные или тандемные диатела (TandAb®), Anticalin®, минитела Nanobody®, BiTE®, белки с анкириновым повтором или DARPIN®, Avimer®, DART, TCR-подобные

антитела, Adnectin®, Affilin®, Trans-body®, Affibody®, TrimerX®, микробелки, Fynomer®, Centyrin® и KALBITOR®.

[0041] Иммуноглобулин может быть получен из любого из общеизвестных изоформ, в том числе, без ограничения, IgA, секреторного IgA, IgG, IgE и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области и включают, без ограничения, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. «Изоформ» относится к классу или подклассу антитела (например, IgM или IgG1), кодирующемуся генами константной области тяжелой цепи. Термин «антитело» включает в себя, в качестве примера, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе Ab; моноклональные и поликлональные Ab; химерные и гуманизированные Ab; человеческие и отличные от человеческих Ab; полностью синтетические Ab; и одноцепочечные Ab. Отличное от человеческого Ab может быть гуманизировано рекомбинантными способами для снижения его иммуногенности у человека. Если явным образом не указано иное, а также если контекст не указывает иное, термин «антитело» также включает антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающую часть любого из вышеупомянутых иммуноглобулинов и включает моновалентный и бивалентный фрагмент или участок и одноцепочечное Ab.

[0042] «Антигенсвязывающая молекула», «антигенсвязывающая часть», «антигенсвязывающий фрагмент» или «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий домен» относится к любой молекуле, которая содержит антигенсвязывающие части (например, CDR) антитела, из которого происходит молекула. Антигенсвязывающая молекула может включать антигенные определяющие комплементарность области (CDR). Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, dAb, линейные антитела, антитела в виде scFv и мультиспецифические антитела, образованные из антигенсвязывающих молекул. Пептитела (т. е. слитые молекулы Fc, содержащие пептидные связывающие домены) представляют собой еще один пример 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, участвующей в гиперпролиферативном заболевании, или с вирусным или бактериальным антигеном. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула или домен связывается с CD19. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула или домен представляет собой фрагмент антитела, который специфически связывается с антигеном, включая его одну или более определяющих комплементарность областей (CDR). В

дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

[0043] В некоторых случаях CDR по существу идентична таковой в эталонном антителе (например, антителе по настоящему описанию) и/или последовательности CDR, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR (например, CDR, предложенной в настоящем описании, например в таблице 4) в том смысле, что она либо идентична последовательности, либо содержит 1, 2, 3, 4 или 5 (например, 1–5) аминокислотных замен по сравнению с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR в том смысле, что она демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR в том смысле, что она демонстрирует по меньшей мере 96%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR, в том смысле, что одна аминокислота в CDR удалена, добавлена или заменена по сравнению с эталонной CDR, при этом CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична последовательности эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR, в том смысле, что 2, 3, 4 или 5 (например, 2–5) аминокислот в CDR удалены, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, при этом CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична последовательности эталонной CDR. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связывает один и тот же антиген в качестве эталонного антитела. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент перекрестно конкурирует с эталонным антителом, например, связываясь с по существу одним и тем же или идентичным эпитопом в качестве эталонного антитела.

[0044] Антигенсвязывающий фрагмент может быть получен любым способом. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может быть получен ферментативно или химически путем фрагментации интактного антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может быть получен рекомбинантно (например, путем экспрессии сконструированной последовательности нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может быть получен полностью или частично синтетическим образом. В

некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может иметь длину по меньшей мере около 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 аминокислот или более; в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 200 аминокислот (например, 50–100, 50–150, 50–200 или 100–200 аминокислот).

[0045] Термины «вариабельная область» или «вариабельный домен» используются взаимозаменяемо. Вариабельная область обычно относится к части антитела, как правило, к части легкой или тяжелой цепи, обычно к аминоконцу от 110 до 120 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и от 90 до 115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые сильно отличаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности конкретного антитела для его конкретного антигена. Вариабельность последовательности концентрируется в тех областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), тогда как более высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Без ограничений, накладываемых каким-либо конкретным механизмом или теорией, считается, что CDR легкой и тяжелой цепей главным образом отвечают за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В определенных вариантах осуществления вариабельная область представляет собой вариабельную область человека. В определенных вариантах осуществления вариабельная область содержит CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) человека. В различных вариантах осуществления вариабельная область представляет собой вариабельную область примата (например, нечеловекообразного примата). В определенных вариантах осуществления вариабельная область содержит CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) примата.

[0046] Термины «VL» и «домен VL» используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы.

[0047] Термины «VH» и «домен VH» используются взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы.

[0048] Обычно используют ряд определений CDR: Нумерация по Kabat, нумерация по Chothia, нумерация AbM или нумерация по контактному определению. Определение AbM является компромиссом между двумя определениями, используемыми в программе моделирования антител AbM компании Oxford Molecular. Контактное определение основано на анализе доступных сложных кристаллических структур.

Таблица 1. Нумерация CDR

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Контактное определение
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B (нумерация по Kabat)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
H1	H31--H35 (нумерация по Chothia)	H26--H35	H26--H32	H30--H35
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0049] Термин «нумерация по Kabat» и подобные термины признаны в данной области и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей антитела или их антигенсвязывающей молекуле. В определенных аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации по Kabat (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) *Ann NY Acad Sci* 190: 382-391 and Kabat EA *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Согласно системе нумерации по Kabat CDR в молекуле тяжелой цепи антитела обычно присутствуют в аминокислотных положениях с 31 по 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие за 35 (обозначаемые в схеме нумерации по Kabat как 35A и 35B) (CDR1), аминокислотных положениях с 50 по 65 (CDR2) и аминокислотных положениях с 95 по 102 (CDR3). Согласно системе нумерации по Kabat CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно присутствуют в аминокислотных положениях с 24 по 34 (CDR1), аминокислотных положениях с 50 по 56 (CDR2) и аминокислотных положениях с 89 по 97 (CDR3). В конкретном варианте осуществления CDR антител, описанных в настоящем документе, были определены в соответствии со схемой нумерации по Kabat.

[0050] В определенных аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации по Chothia, которая относится к местоположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), *J Mol Biol* 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) *J Mol Biol* 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) *J Mol Biol* 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) *J Mol Biol* 215(1): 175-82; и патент США № 7,709,226).

Как правило, при использовании нумерации по Kabat петля Chothia CDR-H1 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи от 26 до 32, 33 или 34, петля Chothia CDR-H2 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи от 52 до 56, а петля Chothia CDR-H3 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи от 95 до 102, в то время как петля Chothia CDR-L1 присутствует в аминокислотах легкой цепи от 24 до 34, петля Chothia CDR-L2 присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля Chothia CDR-L3 присутствует в аминокислотах легкой цепи от 89 до 97. Конец петли Chothia CDR-H1 при нумерации с использованием подхода по Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации по Kabat имеет вставки в H35A и H35B; если как 35A, так и 35B отсутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, петля заканчивается на 34). В конкретном варианте осуществления CDR антител, описанных в настоящем документе, были определены в соответствии со схемой нумерации по Chothia.

[0051] Термины «константная область» и «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют значение, распространенное в данной области. Константная область представляет собой участок антитела, например карбоксильную концевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с переменным доменом иммуноглобулина.

[0052] Термин «тяжелая цепь» при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, которая приводит к образованию классов антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

[0053] Термин «легкая цепь» при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например каппа (κ) или лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области. В конкретных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

[0054] Термин «антиген» относится к соединению, композиции или веществу, которое может стимулировать выработку антител или Т-клеточный ответ у человека или животного, включая композиции (например, включающую опухолеспецифичный белок), которые вводят человеку или животному или которые абсорбируются организмом

человека или животного. Антиген вступает в реакцию с продуктами конкретного гуморального или клеточного иммунитета, в том числе индуцированными гетерологичными антигенами, такими как описанные в настоящем документе антигены. «Антиген-мишень» или «представляющий интерес антиген-мишень» представляет собой антиген, который по существу не встречается на поверхности других нормальных (нужных) клеток и с которым должен связываться связывающий домен CAR, рассматриваемый в настоящем документе. Специалисту в данной области будет понятно, что любая макромолекула, в том числе практически все белки или пептиды, может выступать в качестве антигена. Антиген может быть эндогенно экспрессирован, т. е. экспрессирован геномной ДНК, или может быть рекомбинантно экспрессирован. Антиген может быть специфичным к определенной ткани, такой как раковая клетка, или может быть экспрессирован в широком смысле. Кроме того, фрагменты более крупных молекул могут функционировать в качестве антигенов. В одном варианте осуществления антигены представляют собой опухолевые антигены. В одном конкретном варианте осуществления антиген представляет собой весь CD19 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антиген может включать, без ограничений, следующее из: 707-AP (707 аланин-пролина), аFP (альфа (α)-фетопротеина), aRT-4 (антигена аденокарциномы, распознаваемого клетками T4), BAGE (B-антигена; b-катенина/m, b-катенина/мутированного), BCMA (антигена созревания B-клеток), Bcr-abl (области кластера точки разрыва Абельсона), CAIX (карбоангидразы IX), CD19 (кластера дифференцировки 19), CD20 (кластера дифференцировки 20), CD22 (кластера дифференцировки 22), CD30 (кластера дифференцировки 30), CD33 (кластера дифференцировки 33), CD44v7/8 (кластера дифференцировки 44, экзоны 7/8), CAMEL (CTL-распознаваемого антигена меланомы), CAP-1 (карциноэмбрионального антигенного пептида-1), CASP-8 (каспазы-8), CDC27m (мутации 27 цикла клеточного деления), CDK4/m (мутации циклинзависимой киназы 4), CEA (карциноэмбрионального антигена), лектиноподобной молекулы-1 С-типа (CLL-1), CT (антигена рака яичек), Сур-В (циклофилина В), DAM (дифференцирующего антигена меланомы), EGFR (рецептора эпидермального фактора роста), EGFRvIII (рецептора эпидермального фактора роста, вариант III), EGP-2 (эпителиального гликопротеина 2), EGP-40 (эпителиального гликопротеина 40), Erbb2, 3, 4 (гомолога-2, -3, -4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза), ELF2M (фактора элонгации 2, мутированного), ETV6-AML1 (варианта Ets гена б/гена острого миелоидного лейкоза 1 ETS), FBP (фолат-связывающего белка), fAChR (фетального ацетилхолинового рецептора), G250 (гликопротеина 250), GAGE (G-антигена), GD2 (дисиалоганглиозида 2), GD3 (дисиалоганглиозида 3), глипикан-3 (GPC3),

GnT-V (N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V), Gp100 (гликопротеина с молекулярной массой 100 кДа), HAGE (антигена хеликозы), HER-2/neu (человеческого эпидермального рецептора-2/неврологического; также известного как EGFR2), HLA-A (человеческого лейкоцитарного антигена-A) HPV (вируса папилломы человека), HSP70-2M (белка теплового шока 70-2, мутированного), HST-2 (белка перстневидной опухоли человека-2), hTERT или hTRT (обратной транскриптазы теломеразы человека), iCE (кишечной карбоксиэстеразы), IL-13R-a2 (субъединицы альфа-2 рецептора интерлейкина-13), KIAA0205, KDR (рецептора домена вставки киназы), к-легкой цепи, LAGE (L-антигена), LDLR/FUT (липидного рецептора низкой плотности/GDP-L-фукозы: b-D-галактозидазы 2-а-L-фукозилтрансферазы), LeY (антитела Льюиса-Y), L1 CAM (молекулы клеточной адгезии L1), MAGE (антигена меланомы), MAGE-A1 (ассоциированного с меланомой антигена 1), мезотелина, инфицированных мышинным цитомегаловирусом (CMV) клеток, MART-1/Melan-A (антигена меланомы, распознаваемого Т-клетками-1/антигена меланомы А), MC1 R (рецептора меланокортина 1), миозина/m (миозина мутированного), MUC1 (муцина 1), MUM-1, -2, -3 (белка меланомы с универсальными мутациями 1, 2, 3), NA88-A (клона кДНК NA пациента M88), лигандов NKG2D (группы естественных клеток-киллеров 2, члена D), NY-BR-1 (Нью-Йоркского антигена 1 дифференцировки молочной железы), NY-E SO-1 (Нью-Йоркского белка плоскоклеточной карциномы пищевода-1), онкофетального антигена (h5T4), P15 (белка 15), минорного белка p190 bcr-abl (белка bcr-abl с молекулярной массой 190 кД), Pml/RARa (рецептора а промиелоцитарного лейкоза/ретиноевой кислоты), PRAME (преимущественно экспрессируемого антигена меланомы), PSA (простат-специфического антигена), PSCA (антигена стволовых клеток предстательной железы), PSMA (специфического мембранного антигена предстательной железы), RAGE (почечного антигена), RU1 или RU2 (почечного универсального белка 1 или 2), SAGE (антигена саркомы), SART-1 или SART-3 (антигена, отторгающего плоскоклеточные опухоли 1 или 3), SSX1, -2, -3, -4 (белка синовиальной саркомы X1, -2, -3, -4), TAA (опухолеассоциированного антигена), TAG-72 (опухолеассоциированного гликопротеина 72), TEL/AML1 (белка лейкоза семейства транслокации Ets/острого миелоидного лейкоза 1), TPI/m (триозофосфатизомеразы мутированной), TRP-1 (белка 1, родственного тирозинкиназе или gp75), TRP-2 (белка 2, родственного тирозиназе), TRP-2/INT2 (TRP-2/интрон 2), VEGF-R2 (рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов) или WT1 (гена опухоли Вильмса).

[0055] «Мишень» представляет собой любую молекулу, связанную связывающим доменом, антигенсвязывающей системой, CAR или антигенсвязывающим агентом, например антителом.

[0056] Термин «антигенспецифическая область нацеливания» (ASTR) относится к области CAR, нацеленной на специфические антигены. Нацеленные на CAR области являются внеклеточными. В некоторых вариантах осуществления антигенспецифические области нацеливания содержат антитело или его функциональный эквивалент, или его фрагмент, или его производное, и каждая из областей нацеливания направлена на другой антиген. Области нацеливания могут содержать полноразмерные тяжелые цепи, фрагменты Fab, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv), двухвалентные одноцепочечные антитела или диатела, каждое из которых специфично к целевому антигену. Однако существуют многочисленные альтернативы, такие как связанные цитокины (что приводит к распознаванию клеток, несущих рецептор цитокина), аффитела, лиганд-связывающие домены из рецепторов природного происхождения, растворимый белок/пептид-лиганд для рецептора (например, на опухолевой клетке), пептиды и вакцины для стимулирования иммунного ответа, которые могут быть использованы в различных вариантах осуществления настоящего описания. Фактически почти любая молекула, которая связывает данный антиген с высокой аффинностью, может быть использована в качестве антигенспецифической области нацеливания, как будет понятно специалистам в данной области.

[0057] Термин «антигенпрезентирующая клетка» или «APC» относится к клеткам, которые обрабатывают и представляют антигены Т-клеткам. Иллюстративные APC содержат дендритные клетки, макрофаги, В-клетки, определенные активированные эпителиальные клетки и другие типы клеток, способные к стимуляции TCR и соответствующей костимуляции Т-клеток.

[0058] Термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может присутствовать в форме снижения объема опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, снижения пролиферации опухолевых клеток, уменьшения числа метастазов, повышения общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования, повышения продолжительности жизни или облегчения различных физиологических симптомов, ассоциированных с опухолью. Противоопухолевый эффект также может относиться к предупреждению возникновения опухоли.

[0059] Два события или объекта «ассоциированы» друг с другом, если присутствие, уровень и/или форма одного коррелирует с этими же характеристиками другого. Например, объект (например, полипептид, генетическая сигнатура, метаболит, микроорганизм и т. д.) считается ассоциированным с заболеванием, расстройством или состоянием, если его присутствие, уровень и/или форма коррелируют с частотой встречаемости и/или восприимчивостью к заболеванию, расстройству или состоянию (например, в соответствующей популяции). Например, два или более объектов физически

«ассоциированы» друг с другом, если они взаимодействуют, прямо или косвенно, таким образом, что они находятся и/или остаются в физической близости друг от друга (например, связываются). В дополнительных примерах два или более объектов, физически ассоциированных друг с другом, ковалентно связаны или соединены друг с другом или нековалентно связаны, например, посредством водородных связей, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий, магнетизма и их комбинаций.

[0060] «Аффинность связывания» относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное «аффинность связывания» относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1 : 1 между членами пары связывания (например, антитело и антиген). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена рядом способов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, равновесную константу диссоциации (K_D) и равновесную константу ассоциации (K_A). K_D рассчитывают из коэффициента k_{off}/k_{on} , а K_A — из коэффициента k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, а k_{off} — к диссоциации, например, антитела с антигеном. k_{on} и k_{off} можно определить способами, известными специалисту в данной области, такими как BIACORE® или KinExA.

[0061] Термин « K_D » (M) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитела с антигеном или равновесной константе диссоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента, связывающегося с антигеном. Существует обратная взаимосвязь между K_D и аффинностью связывания, следовательно, чем меньше значение K_D , тем больше, т. е. сильнее, аффинность. Таким образом, термины «более высокая аффинность» или «более сильная аффинность» относятся к более высокой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, меньшему значению K_D , и наоборот, термины «более низкая аффинность» или «более слабая аффинность» относятся к более низкой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, большему значению K_D . В некоторых случаях более высокая аффинность связывания (или K_D) конкретной молекулы (например, антитела) с ее интерактивной партнерской молекулой (например, антигеном X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) с другой интерактивной партнерской молекулой (например, антигеном Y) может быть выражена в виде соотношения связывания, определяемого путем деления большего значения K_D (более низкая, или более слабая, аффинность) на меньшее значение K_D (более

высокая, или более сильная, аффинность), например, выраженного в виде 5-кратного или 10-кратного увеличения аффинности связывания, в зависимости от обстоятельств.

[0062] Термин « k_d » (s^{-1} или l/s) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитела с антигеном или константе скорости диссоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента. Указанное значение также называют значением k_{off} .

[0063] Термин « k_a » ($M^{-1} \times s^{-1}$ или l/M) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитела с антигеном или константе скорости ассоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента.

[0064] Термин « K_A » (M^{-1} или l/M) относится к равновесной константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитела с антигеном или равновесной константе ассоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента. Равновесную константу ассоциации получают путем деления k_a на k_d .

[0065] Термин «связывание» обычно относится к нековалентной связи между двумя или более объектами. Прямое связывание включает физический контакт между объектами или функциональными группами. «Непрямое связывание» включает физическое взаимодействие посредством физического контакта с одним или более промежуточными объектами. Связывание двух или более объектов может быть оценено в любом из множества контекстов, например, где взаимодействующие объекты или функциональные группы изучают по отдельности или в контексте более сложных систем (например, когда они ковалентно или иным образом связаны с объектом-носителем и/или в биологической системе, такой как клетка).

[0066] Термины «иммуноспецифически связывается», «иммуноспецифически распознает», «специфически связывается» и «специфически распознает» являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитоп или иммунный комплекс), и такое связывание понятно специалисту в данной области. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, по существу, с более низкой аффинностью, что определяется, например, с помощью иммуноанализов, BIAcore®, прибора KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, г. Бойсе, штат Айдахо) или других анализов, известных в данной области. В конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с ним с K_A , который составляет по меньшей мере $2 \log$, $2,5 \log$, $3 \log$, $4 \log$ или больше по сравнению с K_A , когда молекулы связываются с другим антигеном. Связывание может включать преимущественную ассоциацию связывающего домена, антитела или CAR с мишенью связывающего домена, антитела или CAR по сравнению с ассоциацией

связывающего домена, антитела или CAR с объектом, который не является мишенью (т. е. нецелевое связывание). В некоторых вариантах осуществления связывающий домен, антитело или CAR избирательно связывается с мишенью, если связывание между связывающим доменом, антителом или CAR и мишенью больше чем в 2 раза, больше чем в 5 раз, больше чем в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше чем в 100 раз по сравнению со связыванием связывающего домена, антитела или CAR и объекта, не являющегося мишенью. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен, антитело или CAR селективно связываются с мишенью, если аффинность связывания составляет менее чем около 10^{-5} М, менее чем около 10^{-6} М, менее чем около 10^{-7} М, менее чем около 10^{-8} М или менее чем около 10^{-9} М.

[0067] В другом варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с константой диссоциации (K_d) около 1×10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с антигеном с «высокой аффинностью», когда K_d составляет от около 1×10^{-9} М до около 5×10^{-9} М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с антигеном с «очень высокой аффинностью», когда K_d составляет от 1×10^{-10} М до около 5×10^{-10} М. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула имеет K_d 10^{-9} М. В одном варианте осуществления коэффициент отклонения составляет менее приблизительно 1×10^{-5} . В вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с CD19 с K_d от около 1×10^{-10} М до около 5×10^{-10} М.

[0068] В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая молекула, которая связывается с целевым антигеном человека, например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с CD19 с 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или более высокой аффинностью по сравнению с другими видами целевого антигена при измерении, например, с помощью радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая молекула, описанные в настоящем документе, которые связываются с целевым антигеном человека, будут связываться с другим видом целевого антигена менее чем на 10%, 15% или 20% от связывания антитела или антигенсвязывающей молекулы с антигеном человека, как измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения.

[0069] «Рак» относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые инвазируют соседние ткани и могут также метастазировать к удаленным частям тела через лимфатическую систему или кровотоки. «Рак» или «раковая ткань» может включать опухоль. Примеры рака, которые можно лечить способами согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения, раковые заболевания иммунной системы, включая лимфому, лейкоз, миелому и другие злокачественные новообразования лейкоцитов. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему описанию могут быть использованы для уменьшения размера опухоли, возникшей, например, в результате рака костей, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, рак яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичек, рака матки, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, множественной миеломы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы (НХЛ), первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ПМВКЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДВККЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), трансформированной фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), рака пищевода, рака тонкой кишки, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, хронического или острого лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) (включая не Т-клеточный ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), солидных опухолей детского возраста, лимфоцитарной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, карциномы почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухолевого ангиогенеза, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, экологически индуцированных видов рака, в том числе индуцированных асбестом, других В-клеточных злокачественных опухолей и комбинации указанных видов рака. В одном конкретном варианте осуществления рак представляет множественную миелому. Конкретный вид рака может реагировать на химио- или лучевую терапию, или рак может быть рефрактерным. Рефрактерный рак относится к раку, который не подвергается воздействию хирургического вмешательства, а также рак либо изначально не реагирует на химио- или лучевую терапию, либо рак становится

нечувствительным с течением времени. Рак дополнительно включает рецидивирующую или рефрактерную формы после двух или более линий системной терапии, включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДВККЛ), не определяемую иным образом, первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому после двух или более линий системной терапии, В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности и ДВККЛ, возникающую из фолликулярной лимфомы, и фолликулярную лимфому.

[0070] «Хемокины» представляют собой тип цитокина, который опосредует хемотаксис клеток или направленное перемещение. Примеры хемокинов включают, без ограничения, IL-8, IL-16, эотаксин, эотаксин-3, макрофагальный хемокин (MDC или CCL22), моноцитарный хемотаксический белок 1 (MCP-1 или CCL2), MCP-4, макрофагальный воспалительный белок 1 α (MIP-1 α , MIP-1a), MIP-1 β (MIP-1), гамма-индуцированный белок 10 (IP-10) и хемокин, регулируемый тимусом и активацией (TARC или CCL17).

[0071] Термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» относится к молекуле, сконструированной таким образом, чтобы включать домен связывания и средство активации иммунных клеток (например, Т-клеток, таких как наивные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти, эффекторные Т-клетки памяти, iNKT клетки, NK-клетки или их комбинации) при связывании антигена. CAR также известны как искусственные Т-клеточные рецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен, один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен. Т-клетка, которая была генетически сконструирована для экспрессии химерного антигенного рецептора, может называться CAR Т-клеткой.

[0072] «Внеклеточный домен» (или «ECD») относится к части полипептида, которая, когда полипептид присутствует в клеточной мембране, находится вне клеточной мембраны, во внеклеточном пространстве.

[0073] Используемый в настоящем документе термин «внеклеточный лиганд-связывающий домен» относится к олиго- или полипептиду, способному связывать лиганд, например молекулу клеточной поверхности. Например, внеклеточный лиганд-связывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием (например, раком). Примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды, включают те, которые связаны с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и раковыми клетками.

[0074] За связывающим доменом CAR может следовать «спейсер» или «шарнир», который обозначает область, отодвигающую антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт между клетками, связывание антигена и активацию (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Шарнирная область в CAR по существу находится между трансмембранным (ТМ) и связывающим доменом. В определенных вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и может представлять собой шарнирную область иммуноглобулина дикого типа или измененную шарнирную область иммуноглобулина дикого типа. Другие примеры шарнирных областей, используемых в CAR, описанных в настоящем документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков типа I, таких как CD8 альфа, CD4, CD28 и CD7, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть изменены.

[0075] «Трансмембранная» область или домен представляет собой часть CAR, которая прикрепляет внеклеточную связывающую часть к плазматической мембране иммунной эффекторной клетки и облегчает связывание связывающего домена с целевым антигеном. Трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD3 дзета, однако могут использоваться и другие трансмембранные домены, полученные из CD8 альфа, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В одном варианте осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD137. В определенных вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим, в этом случае он будет содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

[0076] «Внутриклеточный сигнальный домен» или «сигнальный домен» относится к части белка химерного антигенного рецептора, который участвует в трансдукции сообщения эффективного связывания CAR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы вызвать эффекторную клеточную функцию, например активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в клетку-мишень, связанную с CAR, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность, или помощь, или активность, включая секрецию цитокина. Таким образом, термины «внутриклеточный сигнальный домен» или «сигнальный домен», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к части белка, которая трансдуцирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку для выполнения специализированной

функции. Хотя обычно можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать его полностью. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может быть использована вместо всего домена при условии, что она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для трансдукции сигнала эффекторной функции. Внутриклеточный сигнальный домен также известен как «домен сигнальной трансдукции» и обычно происходит из участков цепей CD3 или Fc γ человека.

[0077] Известно, что сигналы, генерируемые только T-клеточным рецептором, недостаточны для полной активации T-клетки и что необходим также вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация T-клеток опосредована двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через T-клеточный рецептор (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют независимо от антигена для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). Цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют способом первичной активации, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры содержащих ITAM первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей, которые имеют особое применение в настоящем изобретении, включают те, которые получены из DAP-12, CD3гамма, CD3дельта и CD3эпсилон.

[0078] Используемый в настоящем документе термин «костимулирующий сигнальный домен» или «костимулирующий домен» относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или Fc-рецепторов, которые обеспечивают второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования T-лимфоцитов при связывании с антигеном. Примеры таких костимулирующих молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 и лиганд, который специфически связывает CD83. Соответственно, хотя в настоящем описании представлены примерные костимулирующие домены, полученные из CD28 и 4-1BB, другие костимулирующие домены могут быть использованы с CAR, описанными в настоящем документе. Включение одного или более костимулирующих сигнальных

доменов может повысить эффективность и экспансию Т-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. Внутриклеточный сигнальный и костимулирующий сигнальный домены могут быть связаны в любом порядке в тандеме с карбоксильным концом трансмембранного домена.

[0079] Хотя было показано, что CAR на основе scFv, сконструированные для включения сигнального домена из CD3 или FcR гамма, демонстрируют сильный сигнал для активации Т-клеток и эффекторной функции, их недостаточно, чтобы вызвать сигналы, способствующие выживанию и экспансии Т-клеток в отсутствие сопутствующего костимулирующего сигнала. Другие CAR, содержащие связывающий домен, шарнир, трансмембранный и сигнальный домен, вместе с одним или несколькими костимулирующими сигнальными доменами (например, внутриклеточные костимулирующие домены, происходящие от 4-1BB, CD28, CD137, CD134 и CD278) могут более эффективно направлять противоопухолевую активность, а также увеличивать секрецию цитокинов, литическую активность, выживаемость и пролиферацию CAR-экспрессирующих Т-клеток *in vitro* в животных моделях и у больных раком (Milone et al., Molecular Therapy, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., Molecular Therapy, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., PNAS, 2009; 106:3360-3365).

[0080] Термин «костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к Т-клеточной реакции, такой как, без ограничения, пролиферация и/или повышение экспрессии или снижение экспрессии ключевых молекул.

[0081] Термин «костимулирующий лиганд» включает молекулу на антигенпрезентирующей клетке, которая специфически связывается с когнатной костимулирующей молекулой на Т-клетке. Связывание костимулирующего лиганда обеспечивает сигнал, который опосредует Т-клеточный ответ, включая, без ограничения, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимулирующий лиганд индуцирует сигнал, дополнительный к первичному сигналу, обеспечиваемому стимулирующей молекулой, например, путем связывания комплекса Т-клеточного рецептора (TCR)/CD3 с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС), нагруженной пептидом. Костимулирующий лиганд может включать, без ограничения, лиганд 3/TR6, лиганд 4-1BB, агонист или антитело, которые связываются с рецептором лиганда Toll, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганд CD30, CD40, CD7, CD70, CD83, медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), ILT4, иммуноглобулин-подобный транскрипт (ILT) 3, индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), лиганд, который специфически

связывается с В7-Н3, бета-рецептор лимфотоксина, белок А, связанный с цепью МНС класса I (MICA), белок В, связанный с цепью МНС класса I (MICB), лиганд OX40, PD-L2 или L1 белка запрограммированной клеточной смерти (PD). Костимулирующий лиганд включает, без ограничения, антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как, без ограничения, 4-1BB, В7-Н3, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD7, ICOS, лиганд, которое специфически связывается с CD83, лимфоцитарный функциональный антиген-1 (LF1), рецептор естественных клеток-киллеров С (NKG2C), OX40, PD-1 или члена 14 суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFSF14 или LIGHT).

[0082] «Костимулирующая молекула» представляет собой когнатного партнера по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клеткой, такой как, без ограничения, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, без ограничения, «костимулирующую молекулу», которая представляет собой когнатного партнера по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клеткой, такой как, без ограничения, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, без ограничения, 4-1BB/CD137, В7-Н3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD 33, CD 45, CD100 (SEMA4D), CD103, CD134, CD137, CD154, CD16, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD22, CD247, CD27, CD276 (В7-Н3), CD28, CD29, CD3 (альфа; бета; дельта; эpsilon; гамма; дзета), CD30, CD37, CD4, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD5, CD64, CD69, CD7, CD80, лиганд CD83, CD84, CD86, CD8 альфа, CD8 бета, CD9, CD96 (Tactile), CD1-la, CD1-lb, CD1-lc, CD1-ld, CDS, CEACAM1, CRT AM, DAP-10, DNAM1 (CD226), Fc-гамма-рецептор, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, ICOS, Ig альфа (CD79a), IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, интегрин, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, LIGHT, LIGHT (член 14 суперсемейства фактора некроза опухоли; TNFSF14), LTBR, Ly9 (CD229), лимфоцитарный функциональный антиген-1 (LFA-1 (CD1 la/CD18), молекулу МНС класса I, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX40, PAG/Cbp, PD-1, PSGL1, SELPLG (CD162), сигнальную молекулу активации лимфоцитов, SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Ly108), SLAMF7, SLP-76, TNF, TNFr, TNFR2, рецептор лиганда Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 или VLA-6 или их фрагменты, усечения или комбинации.

[0083] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую

цепь. В данной области были определены семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В определенных вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков в CDR или в пределах каркасной области (областей) антитела или его антигенсвязывающей молекулы могут быть заменены аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью. Как правило, две последовательности считаются «по существу сходными», если они содержат консервативную аминокислотную замену в соответствующих положениях. Например, определенные аминокислоты, как правило, классифицируются как «гидрофобные» или «гидрофильные» аминокислоты и/или имеют «полярные» или «неполярные» боковые цепи. Замена одной аминокислоты на другую того же типа можно рассматривать как консервативную замену. Примеры классификаций аминокислот приведены в таблицах 2 и 3 ниже:

Таблица 2

Аминокислота	3-буквен. обозначение	1-буквен. обозначение	Свойство	Свойство	Индекс гидропатии
Аланин	Ala	A	неполярная	нейтральная	1,8
Аргинин	Arg	R	полярная	положительная	-4,5
Аспарагин	Asn	N	полярная	нейтральная	-3,5
Аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	отрицательная	-3,5
Цистеин	Cys	C	неполярная	нейтральная	2,5
Глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	отрицательная	-3,5
Глутамин	Gln	Q	полярная	нейтральная	-3,5
Глицин	Gly	G	неполярная	нейтральная	-0,4
Гистидин	His	H	полярная	положительная	-3,2
Изолейцин	Ile	I	неполярная	нейтральная	4,5
Лейцин	Leu	L	неполярная	нейтральная	3,8

Аминокислота	3-буквен. обозначение	1-буквен. обозначение	Свойство	Свойство	Индекс гидропатии
Лизин	Lys	K	полярная	положительная	-3,9
Метионин	Met	M	неполярная	нейтральная	1,9
Фенилаланин	Phe	F	неполярная	нейтральная	2,8
Пролин	Pro	P	неполярная	нейтральная	-1,6
Серин	Ser	S	полярная	нейтральная	-0,8
Треонин	Thr	T	полярная	нейтральная	-0,7
Триптофан	Trp	W	неполярная	нейтральная	-0,9
Тирозин	Tyr	Y	полярная	нейтральная	-1,3
Валин	Val	V	неполярная	нейтральная	4,2

Таблица 3

Двойственные аминокислоты	3-буквен. обозначение	1-буквен. обозначение
Аспарагин или аспарагиновая кислота	Asx	B
Глутамин или глутаминовая кислота	Glx	Z
Лейцин или изолейцин	Xle	J
Неуказанная или неизвестная аминокислота	Xaa	X

[0084] Термин «комбинированная терапия» относится к тем случаям, в которых субъект одновременно подвергается воздействию двух или более терапевтических схем (например, двух или более терапевтических соединений). В некоторых вариантах осуществления две или более схем можно вводить одновременно; в некоторых вариантах осуществления такие схемы можно вводить последовательно (например, все «дозы» первой схемы вводят до введения любых доз второй схемы); в некоторых вариантах осуществления такие агенты вводят в перекрывающихся режимах дозирования. В некоторых вариантах осуществления «введение» комбинированной терапии может включать введение одного или более агента (-ов) или модальности (-ей) субъекту, получающему другой агент (-ы) или модальность (-и) в комбинации. Для ясности, комбинированная терапия не требует, чтобы отдельные агенты вводились вместе в одной композиции (или даже обязательно в одно и то же время), хотя в некоторых вариантах осуществления два или более агента или их

активные фрагменты могут вводиться вместе в комбинированной композиции или даже в комбинированном соединении (например, как часть одного химического комплекса или ковалентного соединения).

[0085] Термин «соответствующий» может быть использован для обозначения положения/идентичности структурного элемента в молекуле или композиции путем сравнения с соответствующей эталонной молекулой или композицией. Например, в некоторых вариантах осуществления мономерный остаток в полимере (например, аминокислотный остаток в полипептиде или остаток нуклеиновой кислоты в полинуклеотиде) может быть идентифицирован как «соответствующий» остатку в соответствующем эталонном полимере. Например, в целях упрощения остатки в полипептиде могут быть обозначены с использованием канонической системы нумерации на основе эталонного полипептида, так что аминокислота «соответствующая» остатку в положении 100, например, не обязательно должна быть 100-й аминокислотой в аминокислотной цепи при условии, что она соответствует остатку, обнаруженному в положении 100 в эталонном полипептиде. Существуют различные стратегии выравнивания последовательностей, включающие такие программы, как, например, BLAST, CS-BLAST, CUDASW++, DIAMOND, FASTA, GGSEARCH/GLSEARCH, Genoogle, HMMER, HHpred/HHsearch, IDF, Infernal, KLAST, USEARCH, parasail, PSI-BLAST, PSI-Search, ScalaBLAST, Sequilab, SAM, SSEARCH, SWAPHI, SWAPHI-LS, SWIMM или SWIPE, которые могут быть использованы, например, для идентификации «соответствующих» остатков в полипептидах и/или нуклеиновых кислотах в соответствии с настоящим описанием.

[0086] Антигенсвязывающая молекула, такая как антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, CAR или TCR, «перекрестно конкурирует» с эталонной связывающей молекулой, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, если взаимодействие между антигеном и первым блоком антигенсвязывающих молекул ограничивает, ингибирует или иным образом снижает способность эталонной связывающей молекулы взаимодействовать с антигеном. Перекрестная конкуренция может быть полной, например связывание антигенсвязывающей молекулы с антигеном полностью блокирует способность эталонной связывающей молекулы связывать антиген, или частичной, например связывание антигенсвязывающей молекулы с антигеном снижает способность эталонной антигенсвязывающей молекулы связывать антиген. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывает тот же или перекрывающийся эпитоп, что и эталонная антигенсвязывающая молекула. В других вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывает другой эпитоп по

сравнению с эталонной антигенсвязывающей молекулой. Для определения того, конкурирует ли одна антигенсвязывающая молекула с другой, можно использовать множество типов анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунный анализ (РИА); твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА); конкурентный сэндвич-анализ (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидин ИФА (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный РИА с прямым мечением с использованием 1–125 меток (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой биотин-авидин ИФА (Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); и РИА с прямым мечением (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82).

[0087] Термин «цитокин» относится к отличному от антитела белку, который высвобождается одной клеткой в ответ на приведение в контакт с конкретным антигеном, при этом цитокин взаимодействует со второй клеткой для опосредования ответа во второй клетке. Цитокин может быть эндогенно экспрессирован клеткой или введен субъекту. Цитокины могут высвобождаться иммунными клетками, в том числе макрофагами, В-клетками, Т-клетками и тучными клетки для распространения иммунного ответа. Цитокины могут индуцировать различные ответы в клетке реципиента. Цитокины могут включать гомеостатические цитокины, хемокины, провоспалительные цитокины, эффекторы и белки острой фазы. Например, гомеостатические цитокины, в том числе интерлейкин (IL) 7 и IL-15, способствуют выживанию и пролиферации иммунных клеток, а провоспалительные цитокины могут способствовать воспалительному ответу. Примеры гомеостатических цитокинов включают, без ограничения, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15 и интерферон гамма (IFN). Примеры провоспалительных цитокинов включают, без ограничения, IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-13, IL-17a, фактор некроза опухоли (TNF)-альфа, TNF-бета, фибробластический фактор роста (FGF) 2, гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), растворимую молекулу межклеточной адгезии 1 (sIAM-1), растворимую молекулу адгезии сосудистого эндотелия 1 (sVCAM-1), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста (PLGF). Примеры эффекторов включают, без ограничения, гранзим А, гранзим В, растворимый лиганд Fas (sFasL) и перфорин. Примеры белков острой фазы включают, без ограничения, С-реактивный белок (CRP) и сывороточный амилоид А (SAA).

[0088] Под терминами «уменьшать», или «снижать», или «смягчать», или «понижать», или «ослаблять» в целом понимается способность композиции, рассматриваемой в настоящем

документе, производить, вызывать или инициировать меньший физиологический ответ (т. е. снижающийся эффект) по сравнению с ответом, вызванным либо только носителем (т. е. активным фрагментом), либо контрольной молекулой/композицией. «Уменьшенное» или «сниженное» количество обычно является «статистически значимым» и может включать снижение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные точки между и выше 1, например 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) по сравнению с ответом (эталонным ответом), вызванным носителем, контрольной композицией.

[0089] Термин «домен» относится к части объекта. В некоторых вариантах осуществления «домен» связан со структурным и/или функциональным признаком субъекта, например, таким образом, что при физическом отделении домена от остальной части его исходного объекта он по существу или полностью сохраняет структурный и/или функциональный признак. В некоторых вариантах осуществления домен может содержать часть объекта, которая, будучи отделенной от этого (родительского) объекта и связанной или соединенной с другим (получающим) объектом, по существу сохраняет и/или придает получающему объекту одну или несколько структурных и/или функциональных особенностей, например таких, которые характеризовали ее в родительском объекте. В некоторых вариантах осуществления домен представляет собой часть молекулы (например, малой молекулы, углевода, липида, нуклеиновой кислоты или полипептида). В некоторых вариантах осуществления домен представляет собой секцию полипептида; в некоторых таких вариантах осуществления домен характеризуется структурным элементом (например, аминокислотной последовательностью или мотивом последовательности, α -спиралью, символом β -листа, символом биспиральной катушки, символом случайной спирали и т. д.) и/или функциональной характеристикой (например, активностью связывания, ферментативной активностью, активностью складывания, сигнальной активностью и т. д.).

[0090] Термин «лекарственная форма» может использоваться для обозначения физически дискретной единицы активного агента (например, системы связывания антигенов или антител) для введения субъекту. Как правило, каждая такая единица содержит заданное количество активного агента. В некоторых вариантах осуществления такое количество представляет собой стандартную дозу (или ее целую фракцию), подходящую для введения в соответствии с режимом дозирования, который, как было определено, коррелирует с требуемым или благоприятным результатом при введении соответствующей популяции. Общее количество терапевтической композиции или агента, вводимого субъекту,

определяется одним или более медицинскими работниками и может включать введение более чем одной лекарственной формы.

[0091] Термин «режим дозирования» может использоваться для обозначения набора одной или более единичных доз, которые вводят индивидуально субъекту. В некоторых вариантах осуществления данный терапевтический агент имеет рекомендованный режим дозирования, который может включать одну или более доз. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования включает множество доз, каждая из которых отделена от других доз во времени. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования включает множество доз, а последовательные дозы отделены друг от друга временными интервалами равной длины; в некоторых вариантах осуществления режим дозирования включает множество доз, а последовательные дозы отделены друг от друга временными интервалами по меньшей мере двумя разными по длительности. В некоторых вариантах осуществления все дозы в пределах режима дозирования имеют одинаковое количество единиц. В некоторых вариантах осуществления различные дозы в пределах режима дозирования имеют разное количество. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования включает первую дозу в первом количестве доз, а затем одну или более дополнительных доз во втором количестве доз, отличном от количества первой дозы. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования периодически регулируется для достижения желаемого или благоприятного результата.

[0092] «Эффекторная клетка» относится к клетке иммунной системы, которая экспрессирует один или более Fc-рецепторов и опосредует одну или более эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления эффекторные клетки могут содержать, без ограничений, один или более из моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток, эозинофилов, тучных клеток, тромбоцитов, больших гранулярных лимфоцитов, клеток Лангерганса, естественных киллеров (NK), Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Эффекторные клетки могут принадлежать любому организму, включая, без ограничения, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян.

[0093] «Эффекторная функция» относится к биологическому результату взаимодействия Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффекторные функции включают, без ограничений, антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный опосредованный фагоцитоз (ADCP) и опосредованную комплементом цитотоксичность (СМС). Эффекторная функция может быть зависимой от связывания антигена, независимой от связывания антигена или обеими. АЗКЦ относится к лизису связанных с антителами клеток-мишеней иммунными эффекторными клетками. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, как правило, под АЗКЦ подразумевают,

что эффекторные клетки, несущие Fc-рецептор (FcR), распознают и впоследствии уничтожают клетки-мишени, покрытые антителом (например, клетки, которые экспрессируют на своей поверхности антигены, с которыми связывается антитело). Эффекторные клетки, которые опосредуют АЗЦК, могут содержать иммунные клетки, которые, без ограничений, включают одно или более из естественных клеток-киллеров (NK), макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов.

[0094] Термин «эпитоп» обозначает локализованную область антигена, с которой может специфически связываться антитело. Эпитопом могут быть, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или смежный эпитоп), или эпитоп может, например, состоять из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, например, с помощью спектроскопии ЯМР, рентгеновской дифракционной кристаллографии, анализов методами ИФА, водородного/дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией с электрораспылением), анализов сканирования олигопептидов на основе массива и/или картирования мутагенеза (например, картирования сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть осуществлена с использованием любого из известных способов в данной области (например, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1–23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Кристаллы антитело : антиген могут быть изучены с помощью хорошо известных методов рентгеновской дифракции и уточнены с помощью компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, distributed by Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37–60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Исследования по картированию мутагенеза могут быть выполнены с помощью любого метода, известного специалистам в данной области. Описания методик мутагенеза, включая методы аланинового сканирования мутагенеза, см., например, в Champe M *et al.*, (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085.

[0095] Термин «эндогенный» в отношении гена, белка и/или нуклеиновой кислоты означает естественное присутствие этого гена, белка и/или нуклеиновой кислоты в клетке, например иммунной клетке.

[0096] Термин «экзогенный» относится к вводимому в клетку агенту, такому как нуклеиновая кислота, ген или белок, например, из внешнего источника. Нуклеиновая кислота, вводимая в клетку, экзогенна, даже если она кодирует белок, который естественным образом встречается в клетке. Такое экзогенное введение нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, можно использовать для увеличения экспрессии белка на уровне, который естественным образом обнаруживается в клетке в аналогичных условиях, например, без введения экзогенной нуклеиновой кислоты.

[0097] Термин «вспомогательное вещество» относится к агенту, который может содержаться в композиции, например, для обеспечения желаемой консистенции или стабилизирующего эффекта. В некоторых вариантах осуществления подходящее вспомогательное вещество может содержать, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол или т. п.

[0098] «Фрагмент» или «часть» материала или объекта, как описано в настоящем документе, имеет структуру, которая содержит дискретную часть целого, например, физического объекта или абстрактного объекта. В некоторых вариантах осуществления фрагмент не содержит одного или более фрагментов, присутствующих в целом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент состоит из или содержит характерный структурный элемент, домен или фрагмент, встречающийся в целом. В некоторых вариантах осуществления полимерный фрагмент содержит или состоит из по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более мономерных единиц (например, остатков), встречающихся в целом полимере. В некоторых вариантах осуществления полимерный фрагмент содержит или состоит из по меньшей мере около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более мономерных единиц (например, остатков), встречающихся в целом полимере (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В некоторых вариантах осуществления весь материал или объект может быть назван «родителем» фрагмента.

[0099] Термин «слитый полипептид» или «слитый белок» обычно относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере два сегмента. Как правило, полипептид, содержащий по меньшей мере два таких сегмента, считается слитым полипептидом, если два сегмента представляют собой фрагменты, которые (1) не содержатся в природе в одном

и том же пептиде, и/или (2) не были связаны ранее или соединены друг с другом в одном полипептиде, и/или (3) были связаны или соединены друг с другом посредством вмешательства человека. В различных вариантах осуществления CAR представляет собой слитый белок.

[0100] Термин «генный продукт» или «продукт экспрессии» обычно относится к РНК, транскрибируемой из гена (до и/или после обработки), или к полипептиду (до и/или после модификации), кодируемому РНК, транскрибируемой из гена.

[0101] Термин «генетически сконструированный» или «сконструированный» относится к способу модификации генома клетки, в том числе, без ограничения, делеции кодирующей или некодирующей области или ее части или вставке кодирующей области или ее части. В некоторых вариантах осуществления клетка, которую модифицируют, представляет собой лимфоцит, например Т-клетку, который может быть получен от пациента или донора. Клетка может быть модифицирована для экспрессии экзогенной конструкции, такой как, например, химерный антигенный рецептор (CAR), которую включают в геном клетки. Конструирование обычно включает манипуляции, производимые человеком. Например, полинуклеотид считается «сконструированным», когда две или более последовательностей, которые в природе не связаны или не соединяются в таком порядке, изменяются человеком с целью их непосредственного связывания или соединения друг с другом в сконструированном полинуклеотиде. В контексте манипуляций с клетками с помощью методов молекулярной биологии клетка или организм считаются «сконструированными», если они подверглись манипуляциям, в результате которых их генетическая информация была изменена (например, был введен новый генетический материал, которого ранее не было, например, путем трансформации, соматической гибридизации, трансфекции, трансдукции, электропорации или другого механизма, или ранее присутствующий генетический материал был изменен или удален, например, путем замены или делеционной мутации, или с помощью других протоколов). В некоторых вариантах осуществления агент связывания представляет собой измененный лимфоцит, например Т-клетку, который может быть получен от пациента или донора. Сконструированная клетка может быть модифицирована для экспрессии экзогенной конструкции, такой как, например, химерный антигенный рецептор (CAR), которую включают в геном клетки. Потомство сконструированного полинуклеотида или агента связывания обычно называют «сконструированным», даже если фактические манипуляции проводили на предшествующем объекте. В некоторых вариантах осуществления «сконструированный» относится к объекту, который был разработан и получен. Термин «сконструированный» относится к агенту (i), структура которого выбирается или была

выбрана человеком; (ii) агент получен способом, требующим вмешательства человека; и/или (iii) агент отличается от природных веществ и других известных агентов.

[0102] «Т-клеточный рецептор» или «TCR» относится к антигенраспознающим молекулам, присутствующим на поверхности Т-клеток. Во время нормального развития Т-клеток каждый из четырех генов TCR, α , β , γ и δ , может перестраиваться, что приводит к появлению самых разнообразных белков TCR. В различных вариантах осуществления Т-клетка, описанная в настоящем документе, была сконструирована для уменьшения, устранения и/или ингибирования поверхностной экспрессии α -цепи рецептора TCR.

[0103] Термин «гетерологичный» означает из любого источника, отличного от встречающихся в природе последовательностей. Например, гетерологичная последовательность, включенная в качестве части костимулирующего белка, представляет собой аминокислоты, которые не встречаются в природе, т. е. не совмещаются с костимулирующим белком человека дикого типа. Например, гетерологичная нуклеотидная последовательность относится к нуклеотидной последовательности, отличной от последовательности, кодирующей костимуляторный белок человека дикого типа.

[0104] Термин «идентичность» означает общее родство между полимерными молекулами, например между молекулами нуклеиновых кислот (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между полипептидными молекулами. Известны способы расчета процентной идентичности между двумя представленными полипептидными последовательностями. Расчет процентной идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, например, может быть выполнен путем выравнивания двух последовательностей для целей оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей для оптимального выравнивания, а неидентичные последовательности могут быть проигнорированы для целей сравнения). Затем сравнивают нуклеотиды или аминокислоты в соответствующих положениях. Если положение в первой последовательности занято тем же остатком (например, нуклеотидом или аминокислотой), что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы идентичны в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных положений, разделяемых последовательностями, при этом дополнительно учитывается количество пробелов и длина каждого пробела, которые могут быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение или выравнивание последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с помощью математического алгоритма, такого как BLAST (базовый инструмент поиска локального выравнивания). В некоторых

вариантах осуществления полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если их последовательности составляют по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%).

[0105] Чтобы рассчитать процент идентичности, сравниваемые последовательности обычно выравнивают таким образом, чтобы получить наибольшее совпадение между ними. Одним из примеров компьютерной программы, которая может быть использована для определения процентной идентичности, является пакет программ GCG, который включает в себя GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.). Компьютерный алгоритм GAP используют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых необходимо определить процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов («совпадающий участок», как определено алгоритмом). В определенных вариантах осуществления стандартная сравнительная матрица (см. Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 for the PAM 250 comparison matrix; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62) также используют алгоритм. Для сравнения последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот существуют и другие алгоритмы, в том числе те, которые доступны в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с пробелами и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Примеры таких программ описаны в Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs,” Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Помимо идентификации аналогичных последовательностей, упомянутые выше программы по существу обеспечивают индикацию степени сходства. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются по существу аналогичными, если по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более

соответствующих остатков являются аналогичными и/или идентичными по сравнению с соответствующим участком остатков (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок составляет по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 325, по меньшей мере 350, по меньшей мере 375, по меньшей мере 400, по меньшей мере 425, по меньшей мере 450, по меньшей мере 475, по меньшей мере 500 или более остатков. Последовательности, имеющие значительное сходство, могут быть гомологами друг друга.

[0106] Термин «существенная идентичность» или «по существу идентичный», когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью) наблюдается идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере примерно в 95%, а более предпочтительно по меньшей мере примерно в 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого известного алгоритма идентификации последовательности, такого как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий ту же или практически аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0107] Применительно к полипептидам термин «существенная идентичность» или «по существу идентичный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафа за делецию по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, могут отличаться консервативными аминокислотными заменами.

[0108] Термины «улучшать», «увеличивать», «ингибировать» и «уменьшать» указывают на значения, которые относятся к исходному уровню или другому эталонному измерению. В некоторых вариантах осуществления соответствующее эталонное измерение может включать измерение в определенной системе (например, у одного индивидуума) в сопоставимых условиях без присутствия (например, до и/или после) агента или лекарственного средства или в присутствии соответствующего сопоставимого эталонного агента. В некоторых вариантах осуществления соответствующее эталонное измерение может включать в себя измерение в сопоставимой системе, которая, как известно или ожидается, будет реагировать сопоставимым образом в присутствии соответствующего агента или лечения.

[0109] «Иммунный ответ» относится к действию клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, естественных клеток-киллеров (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток, или печени (в том числе Ab, цитокинов и комплемента), которое приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или устранению из организма позвоночного инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток, или в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

[0110] Термин «иммунотерапия» относится к лечению субъекта, страдающего или подверженного риску развития заболевания или страдающего рецидивом заболевания, с помощью способа, включающего индуцирование, усиление, подавление или иным образом модификацию иммунного ответа. Примеры иммунотерапии включают, без ограничения, терапию NK-клетками, iNKT-клетками и Т-клетками. Т-клеточная терапия может включать адаптивную Т-клеточную терапию, иммунотерапию инфильтрующими опухоль лимфоцитами (TIL), аутологичную клеточную терапию, модифицированную аутологичную клеточную терапию (eACT™) и аллогенную Т-клеточную трансплантацию. Примеры Т-клеточных терапий описаны в патентных публикациях США № 2014/0154228 и 2002/0006409, патенте США № 5,728,388 и международной публикации № WO2008/081035.

[0111] Т-клетки для иммунотерапии могут быть получены из любого источника, известного в данной области. Например, Т-клетки могут быть дифференцированы *in vitro* из популяции гематопозитических стволовых клеток или могут быть получены от субъекта, например, для трансплантации во второй субъект после конструирования. Т-клетки могут быть получены, например, из мононуклеарных клеток периферической крови (МНКПК), костного мозга, ткани лимфатического узла, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из

очага инфекции, асцитной жидкости, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. Кроме того, Т-клетки могут быть получены из одной или нескольких Т-клеточных линий, доступных в данной области. Т-клетки также могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта, с использованием любого количества методик, известных специалисту в данной области, таких как разделение с помощью FICOLL™ и/или аферез. Дополнительные способы выделения Т-клеток для Т-клеточной терапии описаны в патентной публикации США № 2013/0287748, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0112] Термин «*in vitro*» относится к событиям, происходящим в искусственной среде, например в пробирке, реакционном сосуде, культуре клеток и т. д., а не в многоклеточном организме. Термин «клетка *in vitro*» относится к любой клетке, которая культивируется *ex vivo*. В частности, клетка *in vitro* может включать Т-клетку. Термин «*in vivo*» относится к событиям, которые происходят в многоклеточном организме, таком как человек или животное, не являющееся человеком.

[0113] Термин «выделенный» относится к веществу, которое (1) было отделено от по меньшей мере некоторых компонентов, с которыми оно было связано в более ранний момент времени или с которым в противном случае вещество было бы связано, и/или (2) присутствует в композиции, которая содержит ограниченное или определенное количество или концентрацию одной или более известных или неизвестных загрязнителей. Выделенное вещество в некоторых вариантах осуществления может быть отделено от около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более чем около 99% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) других компонентов, не относящихся к веществам, с которыми вещество было связано в более ранний момент времени, например другими компонентами или загрязняющими веществами, с которыми вещество было ранее или иным образом связано. В некоторых случаях вещество является выделенным, если оно присутствует в композиции, которая содержит ограниченное или сниженное количество или концентрацию молекул одного и того же или аналогичного типа. Например, в некоторых случаях вещество-нуклеиновая кислота, ДНК или РНК является выделенным, если оно присутствует в композиции, которая содержит ограниченное или сниженное количество или концентрацию молекул нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, отличных от вещества. Например, в некоторых случаях полипептидное вещество является выделенным, если оно присутствует в композиции, которая содержит ограниченное или сниженное количество или концентрацию молекул полипептида, отличного от вещества. В

определенных вариантах осуществления количество может представлять собой, например, количество, измеренное относительно количества необходимого вещества, присутствующего в композиции. В определенных вариантах осуществления ограниченное количество может представлять собой количество, которое составляет не более 100% количества вещества в композиции, например не более 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% количества вещества в композиции (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В некоторых случаях композиция является чистой или по существу чистой по отношению к выбранному веществу. В некоторых вариантах осуществления выделенное вещество имеет чистоту около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более чем около 99% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). Вещество является «чистым», если оно по существу не содержит других компонентов или загрязняющих веществ. В некоторых вариантах осуществления вещество по-прежнему можно рассматривать как «выделенное» или даже «чистое» после объединения с определенными другими компонентами, такими как, например, один или более носителей или вспомогательных веществ (например, буфер, растворитель, вода и т. д.); в таких вариантах осуществления процент выделения или чистоты вещества рассчитывают без учета таких носителей или вспомогательных веществ.

[0114] Термин «линкер» (L) или «линкерный домен» или «линкерная область» относится к олиго- или полипептидной области длиной от около 1 до 100 аминокислот, которая, например, связывает любые домены/области CAR и/или scFv или даже одного из этих полипептидов. Линкеры могут состоять из гибких остатков, таких как глицин и серин, так что смежные белковые домены могут свободно перемещаться относительно друг друга. Более длинные линкеры могут использоваться, когда желательно, чтобы два соседних домена не мешали друг другу в пространстве. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Примеры расщепляемых линкеров включают в себя 2A линкеры (например, T2A), 2A-подобные линкеры или их функциональные эквиваленты, а также их комбинации. Специалистам в данной области известны другие линкеры, которые могут быть использованы в контексте этого описания. Линкер может представлять собой часть многоэлементного агента, который соединяет друг с другом различные элементы. Например, полипептид, состоящий из двух или более функциональных или структурных доменов, может включать участок аминокислот между такими доменами, который связывает их друг с другом. В некоторых вариантах осуществления полипептид, включающий линкерный элемент, имеет общую структуру вида S1-L-S2, где S1 и S2 могут быть одинаковыми или разными и представляют собой два домена, связанных друг с

другом линкером. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер имеет длину по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более аминокислот (например, длину от 1 до 10, от 1 до 20, от 1 до 30, от 1 до 40, от 1 до 50, от 1 до 60, от 1 до 70, от 1 до 80, от 1 до 90, от 1 до 100, от 10 до 20, от 10 до 30, от 10 до 40, от 10 до 50, от 10 до 60, от 10 до 70, от 10 до 80, от 10 до 90 или от 10 до 100 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления линкер характеризуется тем, что он не имеет жесткой трехмерной структуры, а вместо этого обеспечивает гибкость полипептида. В другом примере он может использоваться для соединения с несколькими экспрессируемыми полипептидами. Другие линкеры включают нерасщепляемые линкеры. Ряд линкеров используют для реализации настоящего изобретения, в том числе «гибкие линкеры». Последние богаты глицином. Klein et al., *Protein Engineering, Design & Selection* Vol. 27, No. 10, pp. 325–330, 2014; Priyanka et al., *Protein Sci.*, 2013 Feb; 22(2): 153–167.

[0115] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой синтетический линкер. Синтетический линкер может иметь длину от около 10 аминокислот до около 200 аминокислот, например от 10 до 25 аминокислот, от 25 до 50 аминокислот, от 50 до 75 аминокислот, от 75 до 100 аминокислот, от 100 до 125 аминокислот, от 125 до 150 аминокислот, от 150 до 175 аминокислот или от 175 до 200 аминокислот. Синтетический линкер может иметь длину от 10 до 30 аминокислот, например 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Синтетический линкер может иметь длину от 30 до 50 аминокислот, например от 30 до 35 аминокислот, от 35 до 40 аминокислот, от 40 до 45 аминокислот или от 45 до 50 аминокислот.

[0116] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер богат остатками глицина (Gly или G). В некоторых вариантах осуществления линкер богат остатками серина (Ser или S). В некоторых вариантах осуществления линкер богат остатками глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет одну или более пар глицин-серин (GS), например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более пар GS.

[0117] Термин «лимфоцит» включает естественные клетки-киллеры (NK), Т-клетки, iNKT-клетки или В-клетки. NK-клетки представляют собой тип цитотоксических (токсичных для клеток) лимфоцитов, которые представляют собой компонент врожденной иммунной системы. NK-клетки отторгают опухоли и клетки, инфицированные вирусами. Они действуют через процесс апоптоза или запрограммированной клеточной смерти. Их назвали «естественными киллерами», поскольку они не требуют активации для уничтожения клеток. Т-клетки играют важную роль в клеточноопосредованном

иммунитете (без участия антител). Т-клеточные рецепторы (TCR) дифференцируются самостоятельно из других типов лимфоцитов. Тимус, специализированный орган иммунной системы, отвечает главным образом за созревание Т-клеток. Также существует несколько типов Т-клеток, а именно: Т-клетки-хэлперы (например, CD4⁺ клетки), цитотоксические Т-клетки (также известные как ТС, цитотоксический Т-лимфоцит, CTL, Т-киллерная клетка, цитолитическая Т-клетка, CD8⁺ Т-клетки или Т-клетка-киллер), Т-клетки памяти ((i) стволовые T_{SCM} клетки памяти, подобные наивным клетки, представляют собой CD45RO⁻, CCR7⁺, CD45RA⁺, CD62L⁺ (L-селектин), CD27⁺, CD28⁺ и IL-7Rα⁺, но они также экспрессируют значительные количества CD95, IL-2Rβ, CXCR3 и LFA-1, и демонстрируют многочисленные функциональные особенности клеток памяти); (ii) центральные T_{CM} клетки памяти экспрессируют L-селектин и CCR7, они секретируют IL-2, но не IFNγ или IL-4, и (iii) эффекторные T_{EM} клетки памяти, однако, они не экспрессируют L-селектин или CCR7, но продуцируют эффекторные цитокины, такие как IFNγ и IL-4), регуляторные Т-клетки (Treg, Т-клетки-супрессоры или CD4⁺CD25⁺ регуляторные Т-клетки), естественные Т-клетки-киллеры (NKT) и гамма-дельта Т-клетки. В-клетки, с другой стороны, играют роль в гуморальном иммунитете (с участием антител). Они вырабатывают антитела и антигены, выполняют роль антигенпрезентирующих клеток (APC) и превращаются в В-клетки памяти после активации в результате взаимодействия с антигенами. У млекопитающих незрелые В-клетки образуются в костном мозге, откуда и произошло их название.

[0118] Термин «нейтрализующий» относится к антигенсвязывающей молекуле, scFv, антителу или ее фрагменту, которые связываются с лигандом и предупреждают или ослабляют биологический эффект этого лиганда. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, scFv, антитело или ее фрагмент непосредственно блокируют сайт связывания на лиганде или иным образом изменяют способность лиганда связываться косвенными средствами (такими как структурные или энергетические изменения лиганда). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, scFv, антитело или ее фрагмент препятствует выполнению белком, с которым они связаны, своей биологической функции.

[0119] «Нуклеиновая кислота» относится к любой полимерной цепи нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, РНК или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или более остатков природных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или более аналогов нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты получают одним или более из выделения

из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарного шаблона (*in vivo* или *in vitro*), размножения в рекомбинантной клетке или системе, а также химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более остатков в длину (например, от 20 до 100, от 20 до 500, от 20 до 1000, от 20 до 2000 или от 20 до 5000 или более остатков). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью одноцепочечной; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью двуцепочечной. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, включающую по меньшей мере один элемент, который кодирует или является компонентом последовательности, которая кодирует полипептид.

[0120] Термин «функционально связанный» относится к смежному расположению, где описанные компоненты находятся в отношениях, позволяющих им функционировать по назначению. Например, элемент управления «функционально связанный» с функциональным элементом, связан таким образом, что экспрессия и/или активность функционального элемента достигается в условиях, совместимых с элементом управления.

[0121] Термин «пациент» включает любого человека, страдающего от рака (например, рака предстательной железы). В настоящем документе термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо.

[0122] Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид содержит по меньшей мере две аминокислоты, и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые могут содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. В настоящем документе этот термин относится как к коротким цепочкам, которые также обычно называют пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепочкам, которые обычно называют белками, которых существует множество типов. «Полипептиды» включают, например, среди прочего биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные,

аналоги, слитые белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинацию.

[0123] Термин «фармацевтически приемлемый» относится к молекуле или композиции, которая при введении реципиенту не оказывает вредного воздействия на него, или любое вредное воздействие перевешивается пользой для реципиента. Что касается носителя, разбавителя или вспомогательного вещества, используемого для составления композиции, описанной в настоящем документе, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество должны быть совместимы с другими ингредиентами композиции и не быть вредным для ее реципиента, или любой вредный эффект должен быть перевешен пользой для реципиента. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, например жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество или инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке агента из одной части тела в другую (например, из одного органа в другой). Каждый носитель, присутствующий в фармацевтической композиции, должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции и не оказывать вредного воздействия на пациента, либо любое вредное воздействие должно быть перевешено пользой для реципиента. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетатцеллюлоза; порошковую трагакантовую камедь; солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как масло какао и свечные воски; масла, такие как растительное арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; рН-буферные растворы; полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

[0124] Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, в которой активное вещество содержится вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления активный агент присутствует в количестве разовой дозы, подходящей для введения в терапевтической

схеме, которая показывает статистически значимую вероятность достижения заранее определенного терапевтического эффекта при введении соответствующему субъекту или популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена для введения в твердой или жидкой форме, включая, без ограничения, форму, приспособленную для следующего: пероральный прием, например жидкая лекарственная форма для перорального введения (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например предназначенные для буккального, сублингвального и системного всасывания, болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; парентеральное введение, например путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в виде, например, стерильного раствора или суспензии или препарата с замедленным высвобождением; местное применение, например в виде крема, мази, пластыря или спрея с контролируемым высвобождением, применяемого на коже, легких или ротовой полости; интравагинальное или внутривлагалищное введение, например в виде пессария, крема или пены; сублингвальное введение; окулярное введение; трансдермальное введение; или назальное, легочное введение и введение через другие слизистые оболочки.

[0125] Термин «пролиферация» относится к повышению деления клеток, симметричному или асимметричному делению клеток. В некоторых вариантах осуществления «пролиферация» относится к симметричному или асимметричному делению Т-клеток. «Повышенная пролиферация» возникает при увеличении количества клеток в обработанном образце по сравнению с клетками в необработанном образце.

[0126] Термин «эталон» описывает стандарт или контроль, относительно которого выполняется сравнение. Например, в некоторых вариантах осуществления исследуемый агент, животное, индивидуум, популяцию, образец, последовательность или значение сравнивают с эталоном или контролем, который представляет собой агент, животное, индивидуум, популяцию, образец, последовательность или значение. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль тестируют, измеряют и/или определяют по существу одновременно с тестированием, измерением или определением исследуемого объекта. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль является архивным эталоном или контролем, необязательно воплощенным в материальном носителе. Как правило, эталон или контроль определяют или характеризуются в условиях или обстоятельствах, сопоставимых с оцениваемыми. При наличии достаточного сходства можно обосновать использование и/или сравнение с выбранным эталоном или контролем.

[0127] «Регуляторные Т-клетки» («Treg» «Treg-клетки» или «клетки Treg») относятся к линии CD4⁺ Т-лимфоцитов, которые участвуют в контроле определенной иммунной

активности, например аутоиммунитета, аллергии и ответа на инфекцию. Регуляторные Т-клетки могут регулировать активность популяций Т-клеток, а также влиять на некоторые типы клеток врожденной иммунной системы. Tregs можно определить по экспрессии биомаркеров CD4, CD25 и Foxp3, а также по низкой экспрессии CD127. Встречающиеся в природе Treg-клетки обычно составляют около 5–10% периферических CD4+ Т-лимфоцитов. Однако Treg-клетки в опухолевом микроокружении (т. е. Treg-клетки, инфильтрующие опухоль), Treg-клетки могут составлять до 20–30% от общей популяции CD4+ Т-лимфоцитов.

[0128] Термин «образец» обычно относится к аликвоте материала, полученного или происходящего из представляющего интерес источника. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник представляет собой биологический источник или источник окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник может содержать клетку или организм, например популяцию клеток, ткань или животное (например, человека). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник содержит биологическую ткань или жидкость. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или жидкость может включать амниотическую жидкость, внутриглазную жидкость, асцит, желчь, костный мозг, кровь, грудное молоко, спинномозговую жидкость, серу, хилус, эякулят, эндолимфу, экссудат, фекалии, желудочную кислоту, желудочный сок, лимфу, слизь, перикардальную жидкость, перилимфу, перитонеальную жидкость, плевральную жидкость, гной, слизистые выделения, слюну, кожное сало, сперму, сыворотку, смегму, мокроту, синовиальную жидкость, пот, слезы, мочу, вагинальный секрет, жидкость стекловидного тела, рвотные массы и/или их комбинации или компонент(ы). В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость может содержать внутриклеточную жидкость, внеклеточную жидкость, внутрисосудистую жидкость (плазму крови), интерстициальную жидкость, лимфатическую жидкость и/или внутриклеточную жидкость. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость может содержать растительный экссудат. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или образец могут быть получены, например, путем аспирации, биопсии (например, тонкоигольной или тканевой биопсии), мазка (например, орального, назального, кожного или вагинального мазка), соскоба, операции, промывания или лаважа (например, бронхоальвеолярного, дуктального, назального, глазного, орального, маточного, вагинального или другого промывания или лаважа). В некоторых вариантах осуществления биологический образец содержит клетки, полученные от субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой «первичный образец», полученный

непосредственно из источника, представляющего интерес, любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления, как будет очевидно из контекста, термин «образец» относится к препарату, который получают путем обработки (например, путем удаления одного или более компонентов и/или путем добавления одного или более агентов к) первичному образцу. Такой «обработанный образец» может содержать, например, нуклеиновые кислоты или белки, экстрагированные из образца или полученные путем воздействия на первичный образец одной или более методиками, такими как амплификация или обратная транскрипция нуклеиновой кислоты, выделение и/или очистка определенных компонентов и т. д.

[0129] «Одноцепочечный вариабельный фрагмент», «одноцепочечные вариабельные фрагменты антитела» или «scFv антитела» относятся к формам антител, содержащих вариабельные области только тяжелой и легкой цепей, соединенных линкерным пептидом.

[0130] Термин «стадия рака» относится к качественной или количественной оценке уровня прогрессирования рака. В некоторых вариантах осуществления критерии, используемые для определения стадии рака, могут включать, без ограничения, один или более из следующих: локализация рака в организме, размер опухоли, распространение рака на лимфатические узлы, распространение рака на одну или несколько различных частей тела и т. д. В некоторых вариантах осуществления определение стадии рака может быть выполнено с использованием так называемой системы TNM, согласно которой Т означает размер и распространенность основной опухоли, обычно называемой первичной опухолью; N относится к количеству расположенных рядом лимфатических узлов, пораженных раком; и M относится к наличию или отсутствию метастазов. В некоторых вариантах осуществления рак может быть отнесен к 0-й стадии (присутствуют аномальные клетки, не распространившиеся на близлежащие ткани, также называемый карциномой *in situ* или CIS; CIS не является раком, хотя может стать раком), стадиям I-III (рак присутствует; чем выше число, тем больше опухоль и тем больше она распространилась в близлежащие ткани) или стадии IV (рак распространился в отдаленные части тела). В некоторых вариантах осуществления рак может быть отнесен к стадии, выбранной из группы, состоящей из следующего: *in situ*; локализованный (рак ограничен местом его начала, без признаков распространения); региональный (рак распространился в ближайшие лимфатические узлы, ткани или органы); отдаленный (рак распространился на удаленные части тела); и неизвестный (недостаточно информации для определения стадии).

[0131] Термин «стимуляция» относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующей молекулы с ее когнатным лигандом, при этом связывание опосредует явление трансдукции сигнала. «Стимулирующая молекула» представляет

собой молекулу на Т-клетке, например, комплекс Т-клеточного рецептора (TCR)/CD3, который специфически связывается с когнатным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке. «Стимулирующий лиганд» представляет собой лиганд, который при присутствии на антигенпрезентирующей клетке (например, APC, дендритной клетке, В-клетке и т. п.) может специфически связываться со стимулирующей молекулой на Т-клетке, за счет чего опосредуется первичный ответ Т-клеткой, включая, без ограничения, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и т. п. Стимулирующие лиганды включают, но не ограничиваются ими, антитело к CD3 (такое как ОКТ3), молекулу МНС класса I, нагруженную пептидом, суперагонистическое антитело к CD2 и суперагонистическое антитело к CD28.

[0132] Фраза «терапевтический агент» может относиться к любому агенту, который вызывает желаемый фармакологический эффект при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления агент считается терапевтическим агентом, если он демонстрирует статистически значимый эффект в соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция может представлять собой популяцию моделей организмов или людей. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция может быть определена по различным критериям, таким как определенная возрастная группа, пол, генетический фон, предшествующие клинические состояния, в соответствии с наличием или отсутствием биомаркера и т. д. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой вещество, которое может быть использовано для облегчения, смягчения, снижения, подавления, предотвращения, отсрочки начала, уменьшения тяжести и/или снижения частоты проявления одного или более симптомов или признаков заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой агент, который был или должен быть одобрен государственным органом до его продажи для введения людям. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой агент, для которого для введения человеку требуется медицинское назначение.

[0133] «Терапевтически эффективное количество», «эффективная доза», «эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» терапевтического агента, например сконструированных CAR Т-клеток — это любое количество, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом защищает субъекта от начала заболевания или способствует регрессу заболевания, о чем свидетельствует уменьшение выраженности симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращение ухудшения

состояния или инвалидности вследствие поражения болезнью. Способность терапевтического агента стимулировать регрессию заболевания может быть оценена с помощью различных способов, известных специалисту по клиническим испытаниям, таких как у субъектов-людей во время клинических испытаний, в животных модельных системах, прогнозирующих эффективность у людей, или путем анализа активности средства в анализах *in vitro*.

[0134] Термины «трансдукция» и «трансдуцированный» относятся к процессу, посредством которого чужеродная ДНК вводится в клетку посредством вирусного вектора (см. Jones et al., “Genetics: principles and analysis,” Boston: Jones & Bartlett Publ. (1998)). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор, ДНК-вектор, РНК-вектор, аденовирусный вектор, бакуловирусный вектор, вектор на основе вируса Эпштейна-Барра, вектор на основе паповавируса, вектор на основе осповакцины, вектор на основе вируса простого герпеса, аденовирусный вектор, лентивирусный вектор или любую их комбинацию.

[0135] «Трансформация» относится к любому процессу, посредством которого экзогенная ДНК вводится в клетку-хозяина. Трансформация может происходить в естественных или искусственных условиях с использованием различных способов. Трансформация может быть достигнута с использованием любого известного способа введения чужеродных последовательностей нуклеиновых кислот в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления некоторые методики трансформации выбирают в зависимости от трансформируемой клетки-хозяина и/или вводимой нуклеиновой кислоты. Способы трансформации могут включать, но не ограничиваются ими, вирусную инфекцию, электропорацию и липофекцию. В некоторых вариантах осуществления «трансформированная» клетка стабильно трансформирована, так как вставленная ДНК способна реплицироваться либо как автономно реплицирующаяся плазида, либо как часть хромосомы хозяина. В некоторых вариантах осуществления трансформированная клетка может экспрессировать введенные нуклеиновой кислоты.

[0136] «Лечение» или «осуществление лечения» субъекта относится к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому в отношении субъекта, или введению активного агента субъекту с целью обращения, облегчения, нормализации, ингибирования, замедления или предупреждения возникновения, прогрессирования, развития, тяжести или повторного проявления симптома, осложнения или состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием. В одном варианте осуществления «лечение» или «осуществление лечения» включает частичную ремиссию. В другом

варианте осуществления «лечение» или «осуществление лечения» включает полную ремиссию. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться по отношению к субъекту, у которого отсутствуют признаки соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния, и/или по отношению к субъекту, у которого наблюдаются только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления такое лечение может проводиться по отношению к субъекту, который имеет один или несколько установленных признаков соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться по отношению к субъекту, у которого диагностировано соответствующее заболевание, расстройство и/или состояние, или который страдает от соответствующего заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться по отношению к субъекту, о котором известно, что он имеет один или несколько факторов восприимчивости, которые статистически коррелируют с повышенным риском развития соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния.

[0137] Термин «вектор» относится к реципиентной молекуле нуклеиновой кислоты, модифицированной таким образом, чтобы включать в себя предусмотренную последовательность нуклеиновой кислоты. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной молекуле ДНК, в которую может быть лигирована дополнительная ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, при этом дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы содержат последовательности, которые направляют экспрессию вставленных генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем документе называют «векторами экспрессии». Для конструирования векторов могут использоваться стандартные методики, например, как показано в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки.

[0138] «Ген» для целей настоящего описания включает область ДНК, кодирующую генный продукт (см. далее), а также все области ДНК, которые регулируют продукцию генного

продукта, независимо от того, примыкают ли такие регуляторные последовательности к кодирующим и/или транскрибируемым последовательностям или нет. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничивается ими, промоторные последовательности, терминаторы, трансляционные регуляторные последовательности, такие как сайты связывания рибосом и внутренние сайты входа рибосом, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, точки начала репликации, сайты прикрепления матрицы и области контроля локуса.

[0139] В настоящем описании могут использоваться, если специально не указано обратное, методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, методы рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, доступные специалистам в данной области, многие из которых описаны ниже в иллюстративных целях. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; а также монографии в журналах, таких как *Advances in Immunology*.

[0140] В настоящем документе описана CAR Т-клеточная терапия следующего поколения, нацеленная на один или более антигенов клеточной поверхности, для лечения В-клеточных злокачественных образований, таких как рецидивирующие или рефрактерные (р/р) В-клеточные злокачественные образования. Т-клетка аллогенных химерных антигенных рецепторов (CAR) может быть сконструирована из Т-клеток, полученных от здоровых доноров-людей. Т-клетка аутологичных химерных антигенных рецепторов (CAR) может быть сконструирована из клеток из соответствующих клеток от пациентов-людей, страдающих раком. Эти сконструированные Т-клетки подвергаются вставке сконструированного ретровирусного вектора, кодирующего ген для конструкта CAR, в определенных аспектах анти-CD19 CAR. Конструкты CAR следующего поколения используют один из пяти сигнальных доменов, включая CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , новые, модифицированные CD3 ϵ или DAP-12, в качестве заменителей CD3-дзета, стандартных в CAR.

[0141] CD19 (также известный как кластер дифференциации 19, CD19 В-лимфоцитарный антиген, поверхностный антиген В-лимфоцитов В4, В4, CVID3, антиген дифференциации CD19) представляет собой белок, кодируемый геном CD19 у людей. Если не указано иное, следует понимать, что ссылки на CD19 в настоящем описании относятся к CD19 человека. Его можно обнаружить на поверхности В-клеток. Поскольку экспрессия CD19 является отличительной чертой В-клеток, он может быть полезен в качестве антигена, например, при распознавании В-клеток и раковых клеток, которые возникают из В-клеток, например, В-клеточные лимфомы. Анти-CD19 антитела могут связываться с CD19, экспрессируемым на, например, В-лимфоцитах в периферической крови и селезенке, В-клетках хронического лимфоцитарного лейкоза (В-ХЛЛ), клетках пролимфоцитарного лейкоза (ПЛЛ), клетках волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), клетках острого недифференцированного лимфобластного лейкоза (ОНЛЛ), предшественниках В-клеток острого лимфобластного лейкоза (пре-В-ОЛЛ) и клетках острого лимфобластного лейкоза с нулевым фенотипом (NULL-ОЛЛ) с получением нескольких неограничивающих примеров. Пример фармацевтического продукта, который содержит антигенсвязывающую систему, которая содержит анти-CD19-связывающий домен, представляет собой фармацевтический продукт YESCARTA®. YESCARTA® представляет собой нацеленную на CD19 генетически модифицированную аутологичную Т-клеточную иммунотерапию (см. инструкцию по применению лекарственного препарата YESCARTA®, одобренную FDA, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в отношении способов и композиций, относящихся к иммунотерапии). Другой пример фармацевтического продукта, который содержит антигенсвязывающую систему, которая содержит анти-CD19 связывающий домен, представляет собой фармацевтический продукт KYMRIAH®.

[0142] Как YESCARTA®, так и KYMRIAH® содержат связывающие антитела домены, полученные из анти-CD19 антитела человека. Считается, что многие анти-CD19 антитела связывают эпитоп CD19, кодируемый в экзоне 4 гена CD19. Другие анти-CD19-связывающие домены могут распознавать различные эпитопы CD19 или тот же эпитоп с дифференциальной аффинностью.

[0143] Анти-CD19-связывающий домен настоящего описания может содержать антигенсвязывающие последовательности, встречающиеся в антителе, описанном в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе.

[0144] В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере одну HCDR, представленную в

настоящем документе, например по меньшей мере одну HCDR, раскрытую в таблице 4 или таблице 5. В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает две HCDR, представленные в настоящем документе, например по меньшей мере две HCDR, раскрытые в таблице 4 или таблице 5. В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере три HCDR, представленные в настоящем документе, например три HCDR, раскрытые в таблице 4 или таблице 5.

[0145] В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере одну LCDR, представленную в настоящем документе, например по меньшей мере одну LCDR, раскрытую в таблице 4 или таблице 5. В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает две LCDR, представленные в настоящем документе, например по меньшей мере две LCDR, раскрытые в таблице 4 или таблице 5. В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере три LCDR, представленные в настоящем документе, например три LCDR, раскрытые в таблице 4 или таблице 5.

[0146] В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере одну HCDR, представленную в настоящем документе, например по меньшей мере одну HCDR, раскрытую в таблице 4 или таблице 5, и по меньшей мере одну LCDR, представленную в настоящем документе, например по меньшей мере одну LCDR, раскрытую в таблице 4 или таблице 5. В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает две HCDR, предложенные в настоящем документе, например по меньшей мере две HCDR, раскрытые в таблице 4 или таблице 5, и две LCDR, представленные в настоящем документе, например по меньшей мере две LCDR, раскрытые в таблице 4 или таблице 5. В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает три HCDR, предложенные в настоящем документе, например по три HCDR, раскрытые в таблице 4 или таблице 5, и три LCDR, представленные в настоящем документе, например три LCDR, раскрытые в таблице 4 или таблице 5.

[0147] В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере одну каркасную область тяжелой цепи (FR тяжелой цепи) переменного домена тяжелой цепи, описанного в настоящем документе, например по меньшей мере одну FR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, описанного в таблице 4 или таблице 5. В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию включает две FR

и три FR легкой цепи переменного домена легкой цепи, описанного в настоящем документе, например три FR легкой цепи переменного домена легкой цепи, раскрытого в таблице 4 или таблице 5.

[0150] В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему изобретению включает одну, две или три FR, которые вместе или каждая по отдельности имеют по меньшей мере 75% идентичности (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) с соответствующим FR переменного домена тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, описанного в таблице 4 или таблице 5. В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему изобретению включает одну, две или три FR, которые вместе или каждая по отдельности имеют по меньшей мере 75% идентичности (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) с соответствующим FR переменного домена легкой цепи переменного домена легкой цепи, описанного в таблице 4 или таблице 5.

[0151] В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему изобретению включает по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи, описанным в таблице 4 или таблице 5 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему изобретению включает два переменных домена тяжелой цепи, каждый из которых имеет по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи, описанным в таблице 4 или таблице 5 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), причем переменные домены тяжелой цепи могут быть одинаковыми или разными.

[0152] В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему изобретению включает по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в таблице 4 или таблице 5 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В

различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему изобретению включает два переменных домена легкой цепи, каждый из которых имеет по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в таблице 4 или таблице 5 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), причем переменные домены легкой цепи могут быть одинаковыми или разными.

[0153] В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему изобретению включает по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи, описанным в таблице 4 или таблице 5 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в таблице 4 или таблице 5 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%).

[0154] В различных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему изобретению включает два переменных домена тяжелой цепи, каждый из которых имеет по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи, описанным в таблице 4 или таблице 5 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), и два переменных домена легкой цепи, имеющие по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в таблице 4 или таблице 5 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), причем в различных вариантах осуществления (i) каждый из переменных доменов тяжелой цепи может быть одинаковым или разным; или (ii) каждый из переменных доменов легкой цепи может быть одинаковым или разным.

Таблица 4. Примеры последовательностей анти-CD19 антител (Ab1)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Вариабельный домен тяжелой цепи	EVKLVQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNNSALKSRLTIKDNS KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGTSVTVSS
2	CDRH1 IMGT (белок)	GVSLPDYG
3	CDRH1 по Kabat (белок)	DYGVS
4	CDRH1 по Chothia (белок)	GVSLPDY
5	CDRH2 IMGT (белок)	IWGSETT
6	CDRH2 по Kabat (белок)	VIWGSETTYYNNSALKS
7	CDRH2 по Chothia (белок)	WGSET
8	CDRH3 IMGT (белок)	AKHYYYGGSYAMDY
9	CDRH3 по Kabat (белок)	HYYYGGSYAMDY
10	CDRH3 по Chothia (белок)	HYYYGGSYAMDY
11	Вариабельный домен легкой цепи	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT
12	CDRL1 IMGT (белок)	RASQDISKYLN
13	CDRL1 по Kabat (белок)	RASQDISKYLN
14	CDRL1 по Chothia (белок)	RASQDISKYLN

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
15	CDRL2 IMGT (белок)	HTSRLHS
16	CDRL2 по Kabat (белок)	HTSRLHS
17	CDRL2 по Chothia (белок)	HTSRLHS
18	CDRL3 IMGT (белок)	QQGNTLPYT
19	CDRL3 по Kabat (белок)	QQGNTLPYT
20	CDRL3 по Chothia (белок)	QQGNTLPYT
21	scFv (белок)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGS GKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNS ALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDEAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
22	Линкер (белок)	GSTSGSGKPGSGEGSTKG

Таблица 5. Примеры последовательностей анти-CD19 антител (Ab2)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
23	Вариабельный домен тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKDSGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIPIFGTTNYAQQFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAVAADWLDP WGQGLVTVSS
24	CDRH1 IMGT (белок)	GGTFSSYA

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
25	CDRH1 по Kabat (белок)	SYAIS
26	CDRH1 по Chothia (белок)	GGTFSSY
27	CDRH2 IMGT (белок)	PIIFGTT
28	CDRH2 по Kabat (белок)	GIPIFGTTNYAQQFQG
29	CDRH2 по Chothia (белок)	PIFG
30	CDRH3 IMGT (белок)	AREAVAADWLDP
31	CDRH3 по Kabat (белок)	EAVAADWLDP
32	CDRH3 по Chothia (белок)	AVAADWLD
33	Вариабельный домен легкой цепи	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLT ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSRFTFGPGTKVDIK
34	CDRL1 IMGT (белок)	QSVSSSY
35	CDRL1 по Kabat (белок)	RASQSVSSSYLA
36	CDRL1 по Chothia (белок)	SQSVSSSY
37	CDRL2 IMGT (белок)	GAS
38	CDRL2 по Kabat (белок)	GASSRAT
39	CDRL2 по Chothia (белок)	GAS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
40	CDRL3 IMGT (белок)	QQYGSSRFT
41	CDRL3 по Kabat (белок)	QQYGSSRFT
42	CDRL3 по Chothia (белок)	YGSSRF
43	scFv (белок)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSRFTFGPGTKVDIKGSTS GSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KDSGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTTN YAQQFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYY CAREAVAADWLDPWGQGTLLVTVSS
22	Линкер (белок)	GSTSGSGKPGSGEGSTKG

[0155] Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой сконструированные рецепторы, которые могут направлять или перенаправлять Т-клетки (например, Т-клетки донора) для нацеливания на выбранный антиген. CAR может быть сконструирован таким образом, чтобы распознавать антиген и, связавшись с этим антигеном (например, CD19), активировать иммунную клетку для атаки и уничтожения клетки, несущей этот антиген. Когда эти антигены существуют на опухолевых клетках, иммунная клетка, экспрессирующая CAR, может нацеливаться и уничтожать опухолевую клетку. CAR обычно содержат внеклеточный связывающий домен, который опосредует связывание антигена (например, анти-CD19-связывающий домен), трансмембранный домен, который охватывает или подразумевается, что охватывает клеточную мембрану, когда CAR присутствует на поверхности клетки или клеточной мембране, и внутриклеточный (или цитоплазматический) сигнальный домен.

[0156] Один или более антигенсвязывающих доменов определяют мишень(-и) системы связывания антигена. Связывающий домен может содержать связывающий домен с любым интересующим антигеном, например антитело по настоящему описанию, например связывающий мотив по настоящему описанию. Связывающие домены используют в химерных антигенных рецепторах по меньшей мере частично, поскольку они могут быть

сконструированы как часть одной цепи вместе с другими компонентами CAR. См., например, патенты США №7,741,465 и 6,319,494, а также Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136, Krause et al., *J. Exp. Med.*, Volume 188, No. 4, 1998 (619-626); Finney et al., *Journal of Immunology*, 1998, 161: 2791–2797, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в отношении связывающих доменов в CAR. Связывающий домен или scFv представляет собой одноцепочечный антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи связаны друг с другом. См., например, патенты США №7,741,465 и 6,319,494, а также Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131–136, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в отношении связывающих доменов. При получении из исходного антитела связывающий домен может сохранять некоторые, все или по существу сохранять связывание родительского антитела с целевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления CAR, рассматриваемый в настоящем документе, содержит антигенспецифический связывающий домен, который может представлять собой scFv (мышинный, человеческий или гуманизированный scFv), который связывает антиген, экспрессируемый на раковой клетке. В определенном варианте осуществления scFv связывается с CD19.

[0157] В определенных вариантах осуществления CAR, рассматриваемые в настоящем документе, могут содержать линкерные остатки между различными доменами, например, между доменами VH и VL, добавленными для соответствующего конформационного образования молекулы. CAR, рассматриваемые в настоящем документе, могут содержать один, два, три, четыре или пять или более линкеров. В некоторых вариантах осуществления длина линкера составляет от около 1 до около 25 аминокислот, от около 5 до около 20 аминокислот или от около 10 до около 20 аминокислот или любую промежуточную длину аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот.

[0158] Иллюстративные примеры линкеров включают глициновые полимеры (G)_n; глицин-сериновые полимеры (G₁₋₅S₁₋₅)_n, где n представляет собой целое число по меньшей мере один, два, три, четыре или пять; глицин-аланиновые полимеры; аланин-сериновые полимеры; и другие гибкие линкеры, известные в данной области. Глициновые и глицин-сериновые полимеры относительно неструктурированы и, следовательно, могут служить нейтральным звеном между доменами слитых белков, такими как CAR, описанные в настоящем документе. Глицин имеет больший доступ к пространству phi-psi, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см.

Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173–142 (1992)). Другие линкеры, рассматриваемые в настоящем документе, включают линкеры Уитлоу (см. Whitlow, *Protein Eng.* 6(8): 989–95 (1993)). Специалисту в данной области техники будет понятно, что конструкция CAR в некоторых вариантах осуществления может включать линкеры, которые полностью или частично являются гибкими, например, линкер может включать гибкий линкер, а также одну или несколько частей, придающих менее гибкую структуру, чтобы обеспечить желаемую структуру CAR. В одном варианте осуществления любая из конструкций, описанных в настоящем документе, может содержать линкер «GS». В другом варианте осуществления любые из описанных в настоящем документе конструкций содержат линкер «GSG». В примере глицин-сериновый линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности GS (SEQ ID NO: 45). В примере глицин-сериновый линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности GGGSGGGS (SEQ ID NO: 46). В другом варианте осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 22).

[0159] В определенных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию содержит связывающий домен, который содержит вариабельный домен тяжелой цепи по настоящему описанию, вариабельный домен легкой цепи по настоящему описанию и линкер, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22 (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В определенных вариантах осуществления анти-CD19-связывающий домен по настоящему описанию содержит связывающий домен, который содержит линкер в соответствии с SEQ ID NO: 22.

[0160] Сконструированные CAR, описанные в настоящем документе, могут также содержать N-концевой сигнальный пептид или метку на N-конце scFv или антигенсвязывающего домена. В одном варианте осуществления можно использовать гетерологичный сигнальный пептид. Антигенсвязывающий домен или scFV может быть слит с лидерным или сигнальным пептидом, который направляет зарождающийся белок в эндоплазматический ретикулум с последующей транслокацией на поверхность клетки. Следует понимать, что после экспрессии полипептида, содержащего сигнальный пептид, на поверхности клетки, сигнальный пептид обычно удаляется протеолитически во время обработки полипептида в эндоплазматическом ретикулуме и транслокации на поверхность

клетки. Таким образом, полипептид, такой как конструктор CAR, описанный в настоящем документе, обычно экспрессируется на поверхности клетки в виде зрелого белка, не содержащего сигнального пептида, в то время как предшественник полипептида включает сигнальный пептид. Можно использовать любую подходящую сигнальную последовательность, известную в данной области. Аналогично, можно также использовать любую известную последовательность метки, известную в данной области. В определенных вариантах осуществления связывающий домен по настоящему описанию содержит анти-CD19-связывающий домен, который содержит переменный домен тяжелой цепи по настоящему описанию, переменный домен легкой цепи по настоящему описанию и сигнальную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 44 (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 44).

[0161] В вариантах осуществления CAR содержит scFv, который дополнительно содержит последовательность связывания переменной области. «Последовательность связывания переменной области» представляет собой аминокислотную последовательность, которая соединяет переменную область тяжелой цепи с переменной областью легкой цепи и обеспечивает спейсерную функцию, совместимую с взаимодействием двух субсвязывающих доменов, так что полученный полипептид сохраняет специфическую аффинность связывания с той же молекулой-мишенью, что и антитело, которое содержит одинаковые переменные области легкой и тяжелой цепи. В одном варианте осуществления последовательность связывания переменной области имеет длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот.

[0162] В вариантах осуществления за связывающим доменом CAR может следовать один или более «спейсерных доменов», которые обозначают область, отодвигающую антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт между клеткой и клеткой, связывание антигена и активацию (Patel *et al.*, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412–419). Спейсерный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В определенных вариантах осуществления спейсерный домен представляет собой часть иммуноглобулина, включая, без ограничений, одну или более константных областей тяжелой цепи, например CH2 и CH3. Спейсерный домен может включать аминокислотную последовательность шарнирной области иммуноглобулина природного происхождения или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

[0163] За связывающим доменом CAR может, как правило, следовать один или более «шарнирных доменов», которые играют роль в позиционировании антигенсвязывающего домена в стороне от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт между клеткой и клеткой, связывание антигена и активацию. CAR обычно содержит один или более шарнирных доменов между связывающим доменом и трансмембранным доменом. Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный домен может включать аминокислотную последовательность шарнирной области иммуноглобулина природного происхождения или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

[0164] В некоторых вариантах осуществления система связывания антигена по настоящему описанию может содержать шарнир, который представляет собой, получен из или происходит из (например, содержит весь или фрагмент) иммуноглобулиноподобного шарнирного домена. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен получен из или происходит из иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен выбран из шарнира IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE или IgM или его фрагмента.

[0165] Шарнир может быть получен из природного источника или синтезированного источника. Шарнирные домены, пригодные для использования в CAR, описанных в настоящем документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8 α , CD4, CD28 и CD7, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть изменены, например усеченный шарнирный домен CD28. Шарнир может быть получен из природного источника или синтезированного источника. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая система по настоящему описанию может содержать шарнир, который представляет собой, получен из или происходит из (например, содержит все фрагменты) CD2, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD4, CD7, CD8 α , CD8 β , CD11a (ITGAL), CD11b (ITGAM), CD11c (ITGAX), CD11d (ITGAD), CD18 (ITGB2), CD19 (B4), CD27 (TNFRSF7), CD28, CD28T, CD29 (ITGB1), CD30 (TNFRSF8), CD40 (TNFRSF5), CD48 (SLAMF2), CD49a (ITGA1), CD49d (ITGA4), CD49f (ITGA6), CD66a (CEACAM1), CD66b (CEACAM8), CD66c (CEACAM6), CD66d (CEACAM3), CD66e (CEACAM5), CD69 (CLEC2), CD79A (альфа-цепь, ассоциированная с В-клеточным антигенным рецептором), CD79B (бета-цепь, ассоциированная с В-клеточным антигенным рецепторным комплексом), CD84 (SLAMF5), CD96 (тактильные), CD100 (SEMA4D), CD103 (ITGAE), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD158A (KIR2DL1), CD158B1 (KIR2DL2), CD158B2 (KIR2DL3), CD158C (KIR3DP1), CD158D (KIRDL4), CD158F1 (KIR2DL5A), CD158F2 (KIR2DL5B), CD158K (KIR3DL2), CD160 (BY55), CD162

(SELPLG), CD226 (DNAM1), CD229 (SLAMF3), CD244 (SLAMF4), CD247 (CD3-дзета), CD258 (LIGHT), CD268 (BAFFR), CD270 (TNFSF14), CD272 (BTLA), CD276 (B7-H3), CD279 (PD-1), CD314 (NKG2D), CD319 (SLAMF7), CD335 (NK-p46), CD336 (NK-p44), CD337 (NK-p30), CD352 (SLAMF6), CD353 (SLAMF8), CD355 (CRTAM), CD357 (TNFRSF18), костимулятора индуцибельных Т-клеток (ICOS), LFA-1 (CD11a/CD18), NKG2C, DAP-10, ICAM-1, NKp80 (KLRF1), IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, LFA1-1, SLAMF9, LAT, GADS (GrpL), SLP-76 (LCP2), PAG1/CBP, лиганда CD83, гамма-рецептора Fc, молекулы МНС класса 1, молекулы МНС класса 2, белка рецептора TNF, белка иммуноглобулина, рецептора цитокинов, интегрина, рецепторов, активирующих Nk-клетки или рецептора Toll-лиганда или который представляет собой их фрагмент или комбинацию. В вариантах осуществления шарнирный домен содержит шарнирную область CD28. В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат шарнирный домен из CD28, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 47 (IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO: 47)). В вариантах осуществления шарнирный домен содержит шарнирную область CD28T. В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат шарнирный домен из CD28, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 48 (LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO: 48)). В вариантах осуществления шарнирный домен содержит шарнирную область CD8a. В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат шарнирный домен из CD8a, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 49 или 77

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 49)) TTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 77)).

[0166] Полинуклеотидные и полипептидные последовательности этих шарнирных доменов известны. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий

шарнирный домен, содержит нуклеотидную последовательность, которая по на меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) идентична известной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность шарнирного домена, содержит полипептидную последовательность, которая по на меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) идентична известной полипептидной последовательности.

[0167] В целом «трансмембранный домен» (например, антигенсвязывающая система) относится к домену, имеющему свойство присутствия в мембране, когда он присутствует в молекуле на поверхности клетки или клеточной мембраны (например, охватывая часть или всю клеточную мембрану). Костимуляторный домен для антигенсвязывающей системы по настоящему изобретению может дополнительно содержать трансмембранный домен и/или внутриклеточный сигнальный домен. Не требуется, чтобы каждая аминокислота в трансмембранном домене присутствовала в мембране. Например, в некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен характеризуется тем, что обозначенный участок или часть белка по существу расположены в мембране. Аминокислотные или нуклеиновые последовательности могут быть проанализированы с использованием множества алгоритмов для прогнозирования подклеточной локализации белка (например, трансмембранной локализации). Программы psort (PSORT.org) и prosite (prosite.expasy.org) являются примерами таких программ.

[0168] Тип трансмембранного домена, содержащегося в системе связывания антигенов, описанной в настоящем документе, не ограничивается каким-либо одним типом. В некоторых вариантах осуществления выбран трансмембранный домен, который естественным образом связан со связывающим доменом и/или внутриклеточным доменом. В некоторых случаях трансмембранный домен содержит модификацию одной или более аминокислот (например, делецию, вставку и/или замену), например, во избежание связывания таких доменов с трансмембранным доменом тех же или разных поверхностных

мембранных белков для сведения к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен может быть получен из природного или синтезированного источника. Если источник является природным, домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Примеры трансмембранных доменов могут быть получены из (например, могут содержать по меньшей мере трансмембранный домен) альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD3 дельта, CD3 гамма, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD8 альфа, CD8 бета, CD9, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD16, CD22, CD27, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, TNFSFR25, CD154, 4-1BB/CD137, рецепторов, активирующих NK-клетки, белка иммуноглобулина, B7-H3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD247, CD276 (B7-H3), CD29, CD30, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD84, CD96 (Tactile), CDS, CEACAM1, CRT AM, цитокинового рецептора, DAP-10, DNAM1 (CD226), Fc гамма рецептора, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, Ig альфа (CD79a), IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, индуцибельного Т-клеточного костимулятора (ICOS), интегринов, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, лиганда, связывающегося с CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена-1 (LFA-1; CD1-1a/CD18), молекулы МНС класса 1, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, белка 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), сигнальной лимфоцит-активирующей молекулы (белки SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Ly108), SLAMF7, SLP-76, белка рецептора TNF, TNFR2, TNFSF14, рецептора лиганда Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 или VLA-6 или их фрагментов, усечения или комбинации. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может быть синтетическим (и может, например, содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин). В некоторых вариантах осуществления триплет фенилаланина, триптофана и валина содержится в каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен непосредственно связан или соединен с цитоплазматическим доменом. В некоторых вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер (например, от 2 до 10 аминокислот в длину) может образовывать связь между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой дублет глицина-серина. В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат ТМ домен из CD28, имеющий аминокислотную последовательность, которая на

по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 50 (FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 50)). В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат ТМ домен из CD8a, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 78

(YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO: 51)).

(YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 78)).

[0169] Полинуклеотидные и полипептидные последовательности трансмембранных доменов, предложенных в настоящем документе, известны. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен, содержит нуклеотидную последовательность, которая по на меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) идентична известной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность трансмембранного домена содержит полипептидную последовательность, которая по на меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) идентична известной полипептидной последовательности. Необязательно короткие спейсеры могут образовывать связи между любыми или некоторыми из внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного доменов CAR.

[0170] Известны внутриклеточные сигнальные домены, которые могут передавать сигнал при связывании антигена с иммунной клеткой, и любой из них может быть включен в антигенсвязывающую систему по настоящему описанию. Например, известно, что цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) инициируют

передачу сигнала после связывания TCR с антигеном (см., например, Brownlie et al., Nature Rev. Immunol. 13:257-269 (2013)).

[0171] В вариантах осуществления CAR, рассматриваемые в настоящем документе, содержат внутриклеточный сигнальный домен. «Внутриклеточный сигнальный домен» относится к части CAR, которая участвует в трансдукции сообщения эффективного связывания CAR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы вызвать эффекторную клеточную функцию, например активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в клетку-мишень, связанную с CAR, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен и/или активирующий домен содержит цитоплазматический сигнальный домен, полученный из CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ или DAP-12, или фрагмент, усечение или их комбинацию.

[0172] Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность, или помощь, или активность, включая секрецию цитокина. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая трансдуцирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку для выполнения специализированной функции. Хотя обычно можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать его полностью. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может быть использована вместо всего домена при условии, что она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для трансдукции сигнала эффекторной функции.

[0173] В одном варианте осуществления CAR содержат домен CD3 ϵ , имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVNPDPYEPKRGQRDLYSGLNQRR

(SEQ ID NO: 52). В вариантах осуществления домен CD3 ϵ кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%

идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

AAGAACCGGAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACAAGAGGTGCTGGTGCTGGCGGCA
GACAGAGAGGCCAGAACAAGAAAGACCTCCTCCTGTGCCTAATCCTGACTACGAG
CCCATCCGGAAGGGCCAGAGAGATCTGTACAGCGGCCTGAACCAGCGGCGGATT
(SEQ ID NO: 53).

В вариантах осуществления домен CD3ε кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
CCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTCAATCAGAGGCGAATT
(SEQ ID NO: 54).

[0174] В одном варианте осуществления CAR содержат новый домен CD3ε, упоминаемый как эпсилон-СО (Δ181–185), имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGL (SEQ ID
NO: 87). В вариантах осуществления домен CD3ε, упоминаемый как эпсилон-СО (Δ181–185) кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:
AAGAACCGCAAAGCAAAGGCCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
CCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTC (SEQ ID NO: 79).

[0175] В одном варианте осуществления CAR содержат новый домен CD3ε, упоминаемый как эпсилон-СО (R183K), имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–

90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPVPNPDYEPKIRKGQRDLYSGLNQKRI

(SEQ ID NO: 88). В вариантах осуществления домен CD3ε, упоминаемый как эпсилон-СО (R183K), кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
CCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTCAATCAGAAGCGAATT

(SEQ ID NO: 80).

[0176] В одном варианте осуществления CAR содержат новый домен CD3ε, упоминаемый как эпсилон-СО (S178N.R183K), имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPVPNPDYEPKIRKGQRDLYNGLNQKRI

(SEQ ID NO: 89). В вариантах осуществления домен CD3ε кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
CCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACAACGGTCTCAATCAGAAGCGAATT

(SEQ ID NO: 81).

[0177] В определенных аспектах новые домены CD3ε, эпсилон-СО (Δ181–185), эпсилон-СО (R183K) и эпсилон-СО (S178N.R183K) улучшают направленную миграцию CAR в клеточную мембрану.

[0178] В одном варианте осуществления CAR содержат домен CD3δ, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по

меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 55).

В вариантах осуществления домен CD3 δ кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GGACACGAAACAGGCAGACTTTCTGGCGCCGCTGATACACAGGCCCTGCTGAGAAA
CGACCAGGTGTACCAGCCTCTGAGAGACAGAGATGACGCCAGTACTCTCACCTCG
GCGGCAATTGGGCCAGAAACAAG (SEQ ID NO: 56).

[0179] В одном варианте осуществления CAR содержат домен CD3 γ , имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

GQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO: 57).

В вариантах осуществления домен CD3 γ кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GGACAGGATGGCGTCAGACAGAGCAGAGCCAGCGACAAGCAAACCCTGCTGCCTA
ACGACCAGCTGTACCAGCCTCTGAAGGACAGAGAGGACGACCAGTACAGCCATCTG
CAGGGCAACCAGCTGCGGAGAAAC (SEQ ID NO: 58).

[0180] В одном варианте осуществления CAR содержат домен DAP-12, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID

NO: 59). В вариантах осуществления домен DAP-12 кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности;

например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

ТАСТТСТGGGCAGACTGGTGCCTAGAGGAAGAGGAGCTGCTGAGGCTGCTACCAG
AAAGCAGAGAATCACCGAGACCGAGAGCCCTTACCAGGAGCTGCAGGGACAGAGA
AGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAGAGACCTTACTACAAG (SEQ ID NO: 60).

[0181] Известно, что сигналы, генерируемые только TCR, недостаточны для полной активации Т-клетки и что также может понадобиться вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредована двумя различными классами внутриклеточных сигнальных доменов: первичные сигнальные домены, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (например, комплекс TCR/CD3) и костимулирующие сигнальные домены, которые действуют независимо от антигена, чтобы обеспечить вторичный или костимулирующий сигнал. В некоторых вариантах осуществления CAR, рассматриваемый в настоящем документе, содержит внутриклеточный сигнальный домен, который содержит один или более «костимулирующих сигнальных доменов» и «первичный сигнальный домен».

[0182] CAR, рассматриваемые в настоящем документе, содержат один или более костимулирующих сигнальных доменов для усиления эффективности и экспансии Т-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. Используемый в настоящем документе термин «костимулирующий сигнальный домен» или «костимулирующий домен» относится к внутриклеточному сигнальному домену костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие молекулы могут включать CD27, CD28, CD137(4-1BB), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, TRIM, LCK3, SLAM, DAPIO, LAG3, HVEM и NKD2C, и CD83. В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе) содержат костимулирующий домен CD28, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 61. RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 61).

[0183] В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе) содержат костимулирующий домен 4-1BB, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 77. KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE (SEQ ID NO: 77).

[0184] Компоненты CAR могут быть заменены или «подменены» с использованием стандартных методик биотехнологической обработки для эквивалентных компонентов. Чтобы привести лишь несколько не ограничивающих и неполных примеров, CAR по настоящему описанию может включать связывающий домен, представленный в настоящем документе, в сочетании с шарниром, представленным в настоящем документе, и костимуляторным доменом, представленным в настоящем документе. В некоторых примерах CAR согласно настоящему описанию может содержать лидерную последовательность, как предложено в настоящем документе, вместе со связывающим доменом, как предложено в настоящем документе, в комбинации с шарниром, предложенным в настоящем документе, и с костимулирующим доменом, предложенным в настоящем документе.

[0185] В некоторых аспектах настоящее описание содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-CD19-связывающие домены, предложенные в настоящем документе. В некоторых дополнительных аспектах настоящее описание содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, представленные в настоящем документе, содержащие, без ограничений, нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-CD19-связывающие домены. В некоторых дополнительных аспектах настоящее описание содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающие системы согласно настоящему описанию, содержащие, без ограничений, нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-CD19 химерные антигенные рецепторы.

[0186] В вариантах осуществления конструкт анти-CD19 CAR имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEG
STKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
TTYYNLSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVLLVVGGVLACYSLLV
TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKNRKA
KAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGLNQRRRI (SEQ ID NO: 62).

В вариантах осуществления анти-CD19 CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например,

85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GATATACAGATGACCCAAACGACGTCTAGCCTCAGTGCGTCACTCGGGGATCGGGT
GACAATTAGCTGCAGGGCTAGCCAGGATATTTCAAATATCTTAACTGGTATCAAC
AAAAGCCAGATGGAACCGTAAACTGCTCATATACCACACCAGTCGCCTGCATTCA
GGGGTTCCGAGCCGCTTTTCTGGGAGCGGTAGCGGAACtGAtTATAGCTTGACAATA
AGCAACCTCGAGCAGGAAGACATTGCGACGTA CTCTGTCAGCAAGGGAACACGCT
GCCGTATACCTTCGGTGGCGGCACTAAACTGGAAATCACGGGATCTACGTCTGGAT
CCGGAAAACCTGGATCTGGTGAAGGATCCACTAAAGGCGAAGTCAAGTTGCAAGA
GTCTGGACCTGGTCTCGTGGCACCTTCACAGTCACTCTCCGTTACCTGTACCGTATCT
GGAGTTTCACTTCCCGACTATGGCGTGT CATGGATA CGCCAACCACCGCGAAAAGG
TCTTGAATGGCTGGGCGTTATCTGGGGATCCGAAACCACATACTACA ACTCTGCGCT
CAAGTCACGGCTGACTATTATAAAGGACAATTCAAAGAGCCAAGTGTTCTGAAAA
TGAACAGCCTGCAGACTGATGACACTGCAATATATTA CTGCGCCAAGCATTACTATT
ACGGCGGATCTTACGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCTGTAACAGTCAGC
TCCGCGGCCGCATTGGACAATGAAAAATCCAATGGCACAATAATTCATGTAAAGGG
CAAACACTTGTGTCCTAGCCCACTCTTTCCTGGTCCGTCTAAACCGTTTTGGGTGCTC
GTTGTGGTTGGAGGCGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGTTGGTGACTGTAGCCTTTATAA
TATTCTGGGTTAGAAGCAAACGAAGTAGGCTTTTACATTCAGACTATATGAACATG
ACACCAAGACGCCCCGGCCCCACAAGAAAACACTATCAGCCCTATGCTCCGCCTCG
GGACTTCGCTGCTTACCGAAGCAAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACAC
GAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCC
AGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCG
GTCTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO: 63). В вариантах осуществления анти-CD19

CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGACCGAGTT
ACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACAA
AAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGG
CGTTCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTC
CAACCTGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGC
CTTACACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCT

GGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAG
AGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTACAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTGAG
CGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGG
ACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCC
TGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGAAG
ATGAACTCTCTCCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTAC
TACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTC
CTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGG
GAAAGCACCTGTGCCCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGC
TCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCA
TCATCTTCTGGGTAGAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAAC
ATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCC
TAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCAAGAACCGGAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGA
CAAGAGGTGCTGGTGGTGGCGGCAGACAGAGAGGCCAGAACAAGAAAGACCTCC
TCCTGTGCCTAATCCTGACTACGAGCCCATCCGGAAGGGCCAGAGAGATCTGTACA
GCGGCCTGAACCAGCGGCGGATT (SEQ ID NO: 64).

[0187] В вариантах осуществления конструкт анти-CD19 CAR имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEG
STKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSE
TTYNSALKSRLLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLV
TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSGHETGRLSG
AADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 65).

В вариантах осуществления анти-CD19 CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGACCGAGTTA
CCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACAAAA

GCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTT
CCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACC
TGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACAC
CTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCC
TGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTG
GATTGGTGGCCCCCTCACAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCCT
TCCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTG
GGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTG
ACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCCTGAAGATGAACTCTCTCCAAA
CCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGC
TATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTGGAC
AACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACCTGTGCCCTCT
CCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCT
GGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGA
GAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTA
CCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCGG
ACACGAAACAGGCAGACTTTCTGGCGCCGCTGATACACAGGCCCTGCTGAGAAACGA
CCAGGTGTACCAGCCTCTGAGAGACAGAGATGACGCCAGTACTCTCACCTCGGCGG
CAATTGGGCCAGAAACAAG (SEQ ID NO: 66).

[0188] В одном варианте осуществления конструкт анти-CD19 CAR имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEG
STKGEVKLQESGPELVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWVWSE
TTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLV
TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSGQDGVQRQ
RASDKQTLNPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO: 67).

[0189] В вариантах осуществления анти-CD19 CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности;

например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGACCGAGTTA
CCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACAAAA
GCCCACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTT
CCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACC
TGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAAGGCAACACCCTGCCTTACAC
CTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCC
TGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTG
GATTGGTGGCCCCCTCACAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCCT
TCCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTG
GGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTG
ACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCTGAAGATGAACTCTCTCCAAA
CCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGC
TATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTGGAC
AACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACCTGTGCCCTCT
CCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCT
GGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTAGAAAGCAAGA
GAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTA
CCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCGG
ACAGGATGGCGTCAGACAGAGCAGAGCCAGCGACAAGCAAACCCTGCTGCCTAACGA
CCAGCTGTACCAGCCTCTGAAGGACAGAGAGGACGACCAGTACAGCCATCTGCAGGG
CAACCAGCTGCGGAGAAAC (SEQ ID NO: 68).

[0190] В одном варианте осуществления конструкт анти-CD19 CAR имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNLTPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEG
STKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE
TTYYNLSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLV
TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSYFLGRLVPR
GRGAAEAATRQKITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO: 69).

[0191] В вариантах осуществления анти-CD19 CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGACCGAGTT
ACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACAA
AAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGG
CGTTCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTC
CAACCTGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGC
CTTACACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCT
GGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAG
AGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTGAG
CGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGG
ACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCC
TGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCTGAAG
ATGAACTCTCTCCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTAC
TACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTC
CTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGG
GAAAGCACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGC
TCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCA
TCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAAC
ATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCC
TAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCTACTTCTGGGCAGACTGGTGCCTAGAGGAA
GAGGAGCTGCTGAGGCTGCTACCAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACCGAGAGCCC
TTACCAGGAGCTGCAGGGACAGAGAAGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAG
AGACCTTACTACAAG (SEQ ID NO: 70).

[0192] В вариантах осуществления конструкт анти-CD19 CAR имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSR
FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGST
KGEVKLQESGPGVLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIVGSETT

YYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDBAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS
VTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAF
IIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 71).

[0193] В вариантах осуществления анти-CD19 CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTGGAGACCGAGTT
ACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACAA
AAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGG
CGTTCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTC
CAACCTGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGC
CTTACACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCT
GGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAG
AGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCAC AATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTGAG
CGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGG
ACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCC
TGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCTGAAG
ATGAACTCTCTCCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTAC
TACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTC
CTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGG
GAAAGCACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGC
TCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCA
TCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAAC
ATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCC
TAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCAGGGTGAAGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTC
CTGCTTACCAACAAGGCCAAAACCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAG
AGAGGAATACGACGTCCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGA
AAGCCAAGAAGAAAGAACCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAAAAGGACA
AGATGGCTGAGGCTTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAGAAGAGGAAA
GGGACACGACGGACTGTACCAAGGCCTGAGCACCGCTACCAAGGACACCTACGAC
GCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO: 72).

[0194] В вариантах осуществления конструктор анти-CD19 CAR имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEG
STKGEVKLQESGPELVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSE
TTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGLACYSLLV
TVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGFLNELQKDK
MAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 73).

[0195] В вариантах осуществления анти-CD19 CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGACCGAGTT
ACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACAA
AAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGG
CGTTCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTC
CAACCTGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGC
CTTACACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCT
GGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAG
AGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTGAG
CGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGG
ACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCC
TGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGAAG
ATGAACTCTCTCCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTAC
TACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTC
CTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGG
GAAAGCACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGC
TCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCA
TCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAAC

ATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCC
TAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCCGGGTGAAGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTC
CTGCTTACCAACAAGGCCAAAACCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAG
AGAGGAATACGACGTCCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGA
AAGCCAAGAAGAAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTTTAACGAGCTGCAAAAGGACA
AGATGGCTGAGGCTTTCTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAGAAGAGGAAA
GGGACACGACGGACTGTTCCAAGGCCTGAGCACCGCTACCAAGGACACCTTCGACG
CTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO: 74).

[0196] В вариантах осуществления конструктор анти-CD19 CAR имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности в соответствии с:

DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSR
FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGST
KGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVIVGSETT
YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS
VTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVVGVLACYLLVTVAF
PIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 75).

[0197] В вариантах осуществления анти-CD19 CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с:

GATATACAGATGACCCAAACGACGTCTAGCCTCAGTGCCTCACTCGGGGATCGGGT
GACAATTAGCTGCAGGGCTAGCCAGGATATTTCAAATATCTTAACTGGTATCAAC
AAAAGCCAGATGGAACCGTAAACTGCTCATATACCACACCAGTCGCTGCATTCA
GGGGTTCCGAGCCGCTTTTCTGGGAGCGGTAGCGGAACtGAtTATAGCTTGACAATA
AGCAACCTCGAGCAGGAAGACATTGCGACGTA CTCTGTCAGCAAGGGAACACGCT
GCCGTATACCTTCGGTGGCGGCACTAACTGGAAATCACGGGATCTACGTCTGGAT
CCGAAAACCTGGATCTGGTGAAGGATCCACTAAAGGCGAAGTCAAGTTGCAAGA
GTCTGGACCTGGTCTCGTGGCACCTTCACAGTCACTCTCCGTTACCTGTACCGTATCT
GGAGTTTCACTTCCCGACTATGGCGTGTCATGGATACGCCAACCACCGCGAAAAGG

TCTTGAATGGCTGGGCGTTATCTGGGGATCCGAAACACATACTACAACCTCTGCGCT
CAAGTCACGGCTGACTATTATAAAGGACAATTCAAAGAGCCAAGTGTTCCCTGAAAA
TGAACAGCCTGCAGACTGATGACACTGCAATATATTA CTGCGCCAAGCATTACTATT
ACGGCGGATCTTACGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCTGTAACAGTCAGC
TCCGCGGCCGCATTGGACAATGAAAAATCCAATGGCACAATAATTCATGTAAAGGG
CAAACACTTGTGTCCTAGCCCCTCTTTCCCTGGTCCGTCTAAACCGTTTTGGGTGCTC
GTTGTGGTTGGAGGCGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGTTGGTGACTGTAGCCTTTATAA
TATTCTGGGTAGAGAAGCAAACGAAGTAGGCTTTTACATTCAGACTATATGAACATG
ACACCAAGACGCCCCGGCCCCACAAGAAAACACTATCAGCCCTATGCTCCGCCTCG
GGACTTCGCTGCTTACCGAAGCAGAGTTAAGTTCAGCAGGAGCGCCGACGCACCTG
CCTACCAaCAAGGGCAGAATCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAG
GAATACGATGTGCTGGACAAGAGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAAC
CTAGAAGAAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTATAATGAGCTCCAGAAGGATAAGAT
GGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAAAGAAGAAGAGGCAAGGGC
CACGACGGCCTTACCAGGGCTTAAGCACAGCTACTAAGGACACCTACGACGCCCT
GCACATGCAAGCTCTGCCCCCTAGA (SEQ ID NO: 76).

[0198] В целом, подразумевается, что любой подходящий вирусный вектор или векторы могут быть использованы для трансдукции сконструированных конструктов, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, клетка (например, Т-клетка) трансдуцируется ретровирусным вектором, например, γ -ретровирусным вектором, кодирующим сконструированный анти-CD19 CAR, как описано в настоящем документе.

[0199] Используемый в настоящем документе термин «ретровирус» относится к вирусу РНК, который осуществляет обратную транскрипцию своей геномной РНК в линейную копию двухцепочечной ДНК и впоследствии ковалентно встраивает свою геномную ДНК в геном хозяина. Иллюстративные ретровирусы, подходящие для использования в некоторых вариантах осуществления изобретения, включают, но не ограничиваются ими: Вирус мышинового лейкоза Молони (M-MuLV), вирус мышинной саркомы Молони (MoMSV), вирус мышинной саркомы Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мыши (MuMTV), вирус лейкоза обезьян гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус мышинового лейкоза Френда, вирус стволовых клеток мыши (MSCV), вирус саркомы Руса (RSV) и лентивирусы.

[0200] Используемый в настоящем документе термин «лентивирус» относится к группе (или роду) сложных ретровирусов. Иллюстративные примеры лентивирусов включают, но не ограничиваются ими: ВИЧ (вирус иммунодефицита человека, включая ВИЧ типа 1 и

ВИЧ типа 2); вирус висна-маэди (VMV); вирус козьего артрита-энцефалита (CAEV); вирус инфекционной анемии у лошадей (EIAV); вируса иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); и вирус иммунодефицита обезьян (SIV).

[0201] Термин «вектор» используется в настоящем документе для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Перенесенная нуклеиновая кислота обычно связана с молекулой векторной нуклеиновой кислоты, например, вставлена в нее. Вектор может включать последовательности, которые направляют автономную репликацию в клетке, или могут включать последовательности, достаточные для обеспечения интеграции в ДНК клетки-хозяина. Пригодные векторы включают, например, плазмиды (например, ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды, бактериальные искусственные хромосомы и вирусные векторы. Пригодные вирусные векторы включают, например, дефектные ретровирусы репликации и лентивирусы.

[0202] Как будет очевидно специалисту в данной области, термин «вирусный вектор» широко используется для обозначения либо молекулы нуклеиновой кислоты (например, плазида переноса), которая включает в себя нуклеотидные элементы, полученные из вируса, которые обычно облегчают перенос молекулы нуклеиновой кислоты или интеграции в геном клетки или в вирусную частицу, которая опосредует перенос нуклеиновых кислот. Вирусные частицы, как правило, включают различные вирусные компоненты, а иногда и компоненты клеток-хозяев в дополнение к нуклеиновой кислоте (-ам).

[0203] Термин «вирусный вектор» может относиться либо к вирусу, либо вирусной частице, способной переносить нуклеиновую кислоту в клетку или к самой переносимой нуклеиновой кислоте. Вирусные векторы и плазмиды переноса содержат структурные и/или функциональные генетические элементы, которые в основном происходят из вируса. Термин «ретровирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащей структурные и функциональные генетические элементы или их части, которые в основном происходят из ретровируса. Термин «лентивирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащей структурные и функциональные генетические элементы или их части, включая LTR, которые в основном происходят из лентивируса. Термин «гибридный вектор» относится к вектору, LTR или другой нуклеиновой кислоте, содержащей ретровирусные, например лентивирусные, последовательности и неретровирусные вирусные последовательности. В одном варианте осуществления гибридный вектор относится к вектору или плазмиде переноса, содержащей ретровирусные, например лентивирусные, последовательности для обратной транскрипции, репликации, интеграции и/или упаковки.

[0204] В некоторых вариантах осуществления термины «лентивирусный вектор», «лентивирусный экспрессионный вектор» можно использовать для обозначения лентивирусных плазмид и/или инфекционных лентивирусных частиц. При упоминании в настоящем документе элементов, таких как сайты клонирования, промоторы, регуляторные элементы, гетерологичные нуклеиновые кислоты и т. д., следует понимать, что последовательности этих элементов присутствуют в форме РНК в лентивирусных частицах согласно настоящему изобретению и присутствуют в форме ДНК в ДНК-плазмидах согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, вектор экспрессии представляет собой лентивирусный экспрессионный вектор.

[0205] На каждом конце провируса находятся структуры, называемые «длинными концевыми повторами» или «LTR». Термин «длинный концевой повтор (LTR)» относится к доменам пар оснований, расположенным на концах ретровирусных ДНК, которые в контексте естественных последовательностей являются прямыми повторами и содержат области U3, Rand U5. LTR по существу выполняют функции, имеющие фундаментальное значение для экспрессии ретровирусных генов (например, продвижение, инициация и полиаденилирование транскриптов генов) и вирусной репликации. LTR содержит множество регуляторных сигналов, включая элементы контроля транскрипции, сигналы полиаденилирования и последовательности, необходимые для репликации и интеграции вирусного генома. Вирусный LTR разделен на три области, называемые U3, R и U5. Область U3 содержит энхансеры и промоторные элементы. Область U5 представляет собой последовательность между сайтом связывания праймера и областью R и содержит последовательность полиаденилирования. Область R (повтор) фланкирована областями U3 и U5. LTR состоит из областей U3, R и U5 и появляется как на 5', так и на 3'-конце вирусного генома. Рядом с 5' LTR находятся последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома (сайт связывания праймера с тРНК) и для эффективной упаковки вирусной РНК в частицы (сайт Psi).

[0206] Используемый в настоящем документе термин «сигнал упаковки» или «последовательность упаковки» относится к последовательностям, расположенным в ретровирусном геноме, которые необходимы для вставки вирусной РНК в вирусный капсид или частицу, см., например, Clever et al., 1995. J of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101–2109. Некоторые ретровирусные векторы используют минимальный сигнал упаковки (также называемый последовательностью psi [P]), необходимый для инкапсидации вирусного генома. Таким образом, в данном документе термины «последовательность упаковки», «сигнал упаковки», «psi» и символ «P» используют для обозначения

некодирующей последовательности, необходимой для инкапсидации нитей ретровирусной РНК во время формирования вирусной частицы.

[0207] В различных вариантах осуществления векторы содержат модифицированные 5' LTR и/или 3' LTR. Любой или оба из LTR могут содержать одну или более модификаций, включая, без ограничений, одну или более делеций, вставок или замен. Модификации 3'-LTR часто выполняются для улучшения безопасности лентивирусных или ретровирусных систем, делая вирусы репликативно-дефектными. Используемый в настоящем документе термин «репликативно-дефектный» относится к вирусу, который не способен к полной, эффективной репликации, так что инфицирующие вирионы не продуцируются (например, репликативно-дефектное лентивирусное потомство). Термин «репликационно-компетентный» относится к вирусу дикого типа или мутантному вирусу, который способен к репликации, так что вирусная репликация вируса способна продуцировать инфекционные вирионы (например, репликационно-компетентное лентивирусное потомство).

[0208] Под «самоинактивирующимися» (SIN) векторами подразумевают репликативно-дефектные векторы, например ретровирусные или лентивирусные векторы, в которых правая (3') энхансер-психомоторная область LTR, известная как область U3, была изменена (например, путем делеции или замены), чтобы предотвратить вирусную транскрипцию после первого раунда вирусной репликации. Это связано с тем, что правая (3') LTR U3 область используется в качестве шаблона для левой (5') LTR U3 области во время вирусной репликации, и, таким образом, вирусный транскрипт не может быть создан без U3 энхансера-промотора. В дополнительном варианте осуществления изобретения 3'LTR модифицируется таким образом, что область U5 заменяется, например, идеальной последовательностью поли(A). Следует отметить, что в настоящем документе также рассматриваются модификации LTR, такие как модификации 3'LTR, 5'LTR или как 3', так и 5'LTR.

[0209] Дополнительное повышение безопасности обеспечивается заменой U3-области 5'LTR на гетерологичный промотор для управления транскрипцией вирусного генома во время продуцирования вирусных частиц. Примеры гетерологичных промоторов, которые могут быть использованы, включают, например, промоторы вируса обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), цитомегаловируса (CMV) (например, немедленный ранний), вирус мышинного лейкоза Молони (MoMLV), вируса саркомы Руса (RSV) и вируса простого герпеса (HSV) (тимидин-киназа). Типичные промоторы способны управлять высокими уровнями транскрипции независимо от Tat способом. Такая замена снижает вероятность рекомбинации для создания репликационно-компетентного вируса, поскольку в системе производства вирусов нет полной последовательности U3. В определенных вариантах осуществления гетерологичный промотор обладает дополнительными

преимуществами для контроля способа транскрипции вирусного генома. Например, гетерологичный промотор может быть индуцибельным, так что транскрипция всего или части вирусного генома будет происходить только при наличии индукционных факторов. Индукционные факторы включают, без ограничений, одно или более химических соединений или физиологических состояний, таких как температура или pH, в которых культивируют клетки-хозяева.

[0210] В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы содержат элемент TAR. Термин «TAR» относится к генетическому элементу «реакция трансактивации», расположенному в R-области лентивирусных (например, ВИЧ) LTR. Этот элемент взаимодействует с генетическим элементом лентивирусного транс-активатора (tat) для усиления вирусной репликации.

[0211] Под «областью R» понимается область в ретровирусных LTR, начинающаяся с начала кэппинговой группы (т. е. начала транскрипции) и заканчивающаяся непосредственно перед началом тракта поли-А. Область R также определяется как фланкированная областями U3 и U5. Область R играет роль во время обратной транскрипции при разрешении на перенос зарождающейся ДНК из одного конца генома в другой.

[0212] Используемый в настоящем документе термин «элемент FLAP» относится к нуклеиновой кислоте, последовательность которой включает центральный полипуриновый тракт и центральные терминирующие последовательности (сРРТ и СТС) и включает центральный полипуриновый тракт и центральные терминирующие последовательности (сРРТ и СТС) ретровируса, например, ВИЧ-1 или ВИЧ-2. Подходящие элементы FLAP описаны в патенте США № 6,682,907 и в Zennou, et al., 2000, Cell, 101: 173. Во время обратной транскрипции ВИЧ-1 центральная инициация плюс-цепи ДНК на центральном полипуриновом тракте (сРРТ) и центральная терминация на центральной терминирующей последовательности (СТС) приводят к образованию трехцепочечной структуры ДНК — центрального флэпа ДНК ВИЧ-1. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, флэп ДНК может выступать в качестве цис-активной детерминанты ядерного импорта лентивирусного генома и/или может повышать титр вируса.

[0213] В одном варианте осуществления ретровирусные или лентивирусные векторы переноса содержат один или более элементов экспорта. Термин «элемент экспорта» относится к цис-действующему посттранскрипционному регуляторному элементу, который регулирует перенос РНК-транскрипта из ядра в цитоплазму клетки. Примеры элементов экспорта РНК включают, но не ограничиваются ими, элемент обр. ответа (RRE) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (см., например, Cullen et al., 1991. J Virol. 65: 1053; и Cullen et al., 1991. Cell 58: 423) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса

гепатита В (HPRE). Как правило, элемент экспорта РНК размещается в 3' UTR гена и может быть вставлен в одной или нескольких копиях.

[0214] В других вариантах осуществления экспрессия гетерологичных последовательностей в вирусных векторах усиливается за счет включения в векторы посттранскрипционных регуляторных элементов, эффективных сайтов полиаденилирования и, необязательно, сигналов терминации транскрипции в векторы. Различные посттранскрипционные регуляторные элементы могут повышать экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в белке, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита (WPRE; Zufferey et al., 1999, *J Virol.*, 73:2886); посттранскрипционный регуляторный элемент, присутствующий в вирусе гепатита В (HPRE) (Huang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864); и т. п. (Liu et al., 1995, *Genes Dev.*, 9:1766).

[0215] В некоторых вариантах осуществления векторы могут включать регуляторные олигонуклеотиды, обладающие транскрипционной или трансляционной регуляторной активностью. Такой олигонуклеотид может быть использован в различных конфигурациях экспрессии генов для регулирования контроля экспрессии. Олигонуклеотид, регулирующий транскрипцию, может повышать (усиливать) или понижать (заглушать) уровень экспрессии рекомбинантного экспрессионного конструкта. Регуляторные олигонуклеотиды могут избирательно регулировать экспрессию контекстно-специфическим образом, в том числе, например, для обеспечения тканеспецифической, специфической для стадии развития или тому подобной экспрессии полинуклеотида, включая конститутивную или индуцибельную экспрессию. Регуляторный олигонуклеотид по настоящему описанию также может быть компонентом вектора экспрессии или рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, включающей регуляторный олигонуклеотид, оперативно связанный с экспрессируемым полинуклеотидом. Регуляторный элемент может иметь различную длину — от нескольких нуклеотидов до нескольких сотен нуклеотидов.

[0216] Элементы, направляющие эффективную терминацию и полиаденилирование транскриптов гетерологичных нуклеиновых кислот, повышают экспрессию гетерологичных генов. Сигналы терминации транскрипции обычно находятся ниже сигнала полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления векторы содержат 3' последовательности полиаденилирования полинуклеотида, кодирующего экспрессируемый полипептид. Используемый в настоящем документе термин «сайт поли-А» или «последовательность поли-А» обозначает последовательность ДНК, которая направляет как терминацию, так и полиаденилирование зарождающегося РНК-транскрипта РНК-полимеразой II. Последовательности полиаденилирования могут

способствовать стабильности мРНК за счет добавления поли-А хвоста к 3' концу кодирующей последовательности и, таким образом, вносить вклад в повышение эффективности трансляции. Эффективное полиаденилирование рекомбинантного транскрипта желательно, поскольку транскрипты, лишенные поли-А-хвоста, нестабильны и быстро разрушаются. Иллюстративные примеры сигналов поли-А, которые могут быть использованы в векторе по настоящему описанию, включают идеальную последовательность поли-А (например, ААТААА, АТТААА, АГТААА), последовательность поли-А бычьего гормона роста (BGHPA), последовательность поли-А β-глобина кролика (IβgpA) или другую подходящую гетерологичную или эндогенную последовательность поли-А, известную в данной области.

[0217] В данном документе также описаны нуклеиновые кислоты, оптимизированные по кодонам. «Оптимизированная по кодонам» нуклеиновая кислота относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая была изменена таким образом, что кодоны являются оптимальными для экспрессии в конкретной системе (такой как конкретный вид или группа видов). Например, нуклеотидная последовательность может быть оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих или в конкретных видах млекопитающих (таких как клетки человека) путем замены по меньшей мере одного, более одного или значительного количества кодонов нативной последовательности кодонами, которые чаще или более часто используются в генах этого вида. Оптимизация кодонов не изменяет аминокислотную последовательность кодируемого белка.

[0218] Оптимизированные по кодонам нуклеотидные последовательности, представленные в настоящем описании, могут обеспечивать улучшенные свойства, связанные с эффективностью экспрессии. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, подлежащая транскрипции, может быть оптимизирована для облегчения более эффективной транскрипции и/или трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении цис-регуляторных элементов (например, ТАТА-боксов, сигналов терминации и сайтов связывания белков), сайтов искусственной рекомбинации, chi сайтов, содержания CpG динуклеотидов, отрицательных CpG островов, содержания GC, сайтов проскальзывания полимеразы и/или других элементов, имеющих отношение к транскрипции; последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении криптических сайтов сплайсинга, вторичной структуры мРНК, стабильной свободной энергии мРНК, повторяющихся последовательностей, мотива нестабильности РНК и/или других элементов, имеющих отношение к процессингу и стабильности мРНК; последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении смещения использования кодонов,

адаптивности кодонов, внутренних сайтов *chi*, сайтов связывания рибосом (например, IRES), преждевременных сайтов полиА, последовательностей Шайна — Дальгарно (SD) и/или других элементов, имеющих отношение к трансляции; и/или последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении контекста кодонов, взаимодействия кодонов и антикодонов, сайтов трансляционной паузы и/или других элементов, имеющих отношение к укладке белка.

[0219] Векторы могут содержать один или несколько LTR, при этом любой LTR включает одну или более модификаций, например одну или более нуклеотидных замен, добавлений или делеций. Векторы могут дополнительно включать один или несколько вспомогательных элементов для повышения эффективности трансдукции (например, cPPT /FLAP), вирусной упаковки (например, сигнал упаковки Psi (Ψ), RRE) и/или другие элементы, повышающие экспрессию терапевтического гена (например, поли (A) последовательности), и могут дополнительно включать WPRE или HPRE. Специалисту в данной области будет понятно, что многие другие различные варианты осуществления могут быть созданы на основе существующих вариантов осуществления изобретения.

[0220] «Клетка-хозяин» включает клетки, трансфицированные, инфицированные или трансдуцированные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro* с рекомбинантным вектором или полинуклеотидом согласно настоящему изобретению. Клетки-хозяева могут включать упаковывающие клетки, продуцирующие клетки и клетки, инфицированные вирусными векторами. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, инфицированные вирусным вектором по настоящему изобретению, вводят субъекту, нуждающемуся в терапии. В определенных вариантах осуществления термин «клетка-мишень» используется взаимозаменяемо с клеткой-хозяином и относится к трансфицированным, инфицированным или трансдуцированным клеткам желаемого типа клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

[0221] Для достижения приемлемого титра вируса часто необходимо получение вирусной частицы большого масштаба. Вирусные частицы получают путем трансфекции вектора переноса в линию упаковывающей клетки, которая содержит вирусные структурные и/или вспомогательные гены, например gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vrc, vrx или nef или другие ретровирусные гены.

[0222] Используемый в настоящем документе термин «упаковывающий вектор» относится к вектору экспрессии или вирусному вектору, который не содержит упаковывающего сигнала и содержит полинуклеотид, кодирующий один, два, три, четыре или более вирусных структурных и/или вспомогательных генов. Как правило, упаковывающие векторы включены в упаковывающую ячейку и вводятся в клетку посредством

трансфекции, трансдукции или инфекции. Способы трансфекции, трансдукции или инфекции хорошо известны специалистам в данной области. Ретровирусный/лентивирусный вектор переноса по настоящему изобретению может быть введен в упаковывающую линию клеток, посредством трансфекции, трансдукции или инфекции для получения продуцирующей клетки или клеточной линии. Упаковывающие векторы по настоящему изобретению могут быть введены в клетки человека или клеточные линии обычными способами, включая, например, трансфекцию фосфатом кальция, липофекцию или электропорацию. В некоторых вариантах осуществления упаковывающие векторы вводят в клетки вместе с доминантным селективным маркером, таким как неомицин, гигромицин, пурамицин, бластицидин, зеоцин, тимидинкиназа, DHFR, Gln-синтетаза или ADA, с последующей селекцией в присутствии соответствующего препарата и выделением клонов. Селективный маркерный ген может быть физически связан с генами, кодируемыми упаковывающим вектором, например, с помощью IRES или саморасщепляющихся вирусных пептидов.

[0223] Белки вирусной оболочки (*env*) определяют диапазон клеток-хозяев, которые в конечном итоге могут быть инфицированы и трансформированы рекомбинантными ретровирусами, полученными из клеточных линий. В случае лентивирусов, таких как ВИЧ-1, ВИЧ-2, SIV, FIV и EIV, белки *env* включают *gp41* и *gp120*. В некоторых вариантах осуществления вирусные белки *env*, экспрессируемые упаковочными клетками согласно настоящему изобретению, кодируются на отдельном векторе из вирусных генов *gag* и *pol*, как было описано ранее.

[0224] Иллюстративные примеры ретровирусных генов *env*, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе вариантах осуществления, включают, но не ограничиваются ими: оболочки MLV, оболочки IOAI, BAEV, FeLV-B, RDI 14, SSAV, вируса эболы, вируса Сендай, FPV (вирус чумы птиц) и оболочки вируса гриппа. Аналогичным образом можно использовать гены, кодирующие оболочки РНК-вирусов (например, семейства РНК-вирусов *Picomaviridae*, *Calciviridae*, *Astroviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Reoviridae*, *Bimaviridae*, *Retroviridae*), а также ДНК-вирусов (семейства *Hepadnaviridae*, *Circoviridae*, *Parvoviridae*, *Papovaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae* и *Iridoviridae*). Иллюстративные примеры включают FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, вирус бешенства, ALV, BIV, BL V, EBV, CAEV, SNV, ChTL V, STLV, MPMV SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CTIO и EIAV.

[0225] В других вариантах осуществления изобретения белки оболочки для псевдотипирования вируса по настоящему описанию включают, без ограничения, любой из

следующих вирусов: вирус гриппа А, такой как H1N1, H1N2, H3N2 и H5N1 (птичий грипп), вирус гриппа В, вирус гриппа С, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус гепатита Е, ротавирус, любой вирус из группы вирусов Норвалка, кишечные аденовирусы, парвовирус, вирус лихорадки Денге, оспа обезьян, мононегавирусы, лиссавирусы, такие как вирус бешенства, вирус летучей мыши Лагоса, вирус Мокола, вирус Дювенхаге, вирус летучей мыши европейского типа 1 и 2 и вирус австралийской летучей мыши, эфемеровирус, везикуловирус, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирусы герпеса, такие как вирус простого герпеса типов 1 и 2, ветряной оспы, цитомегаловирус, вирус Эпштейна — Барр (EBV), герпесвирусы человека (HHV), герпесвирусы человека типов 6 и 8, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус папилломы человека, вирус мышинового гамма-герпеса, аренавирусы, такие как вирус аргентинской геморрагической лихорадки, вирус боливийской геморрагической лихорадки, вирус геморрагической лихорадки, ассоциированной с Сабией, вирус венесуэльской геморрагической лихорадки, Вирус лихорадки Ласса, вирус Мачупо, вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), *Bunyaviridae*, такие как вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго, хантавирус, вирус, вызывающий геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, вирус лихорадки долины Рифт, *Filoviridae* (филовирусы), включая геморрагическую лихорадку Эбола и геморрагическую лихорадку Марбург, *Flaviviridae*, включая вирус лесной болезни Кайсанур, вирус Омской геморрагической лихорадки, вирус, вызывающий клещевой энцефалит, и *Paramyxoviridae*, такие как вирус Хендра и вирус Нипах, вирус оспы, альфавирусы, такие как вирус венесуэльского энцефалита, вирус восточного энцефалита, вирус западного энцефалита, SARS-ассоциированный коронавирус (SARS-CoV), вирус Западного Нила, или любой вирус, вызывающий энцефалит.

[0226] Термины «псевдотип» или «псевдотипирование», используемые в настоящем документе, относятся к вирусу, у которого белки оболочки были замещены этими белками другого вируса, обладающего другими характеристиками. Например, ВИЧ может быть псевдотипирован белками оболочки G-протеина вируса везикулярного стоматита (VSV-G), что позволяет ВИЧ инфицировать более широкий круг клеток, поскольку белки оболочки ВИЧ (кодируемые геном env) обычно направляют вирус на клетки, представляющие CD4+.

[0227] Используемый в настоящем документе термин «упаковывающие клеточные линии» используется в отношении клеточных линий, которые не содержат упаковывающего сигнала, но стабильно или временно экспрессируют вирусные структурные белки и ферменты репликации (например, gag, pol и env), которые необходимы для правильной упаковки вирусных частиц. Для получения упаковывающих клеточных линий по настоящему изобретению можно использовать любую подходящую линию клеток. Как

правило, клетки представляют собой клетки млекопитающих. В другом варианте осуществления клетки, используемые для получения упаковывающей клеточной линии, представляют собой клетки человека. Подходящие линии клеток, которые можно использовать для получения упаковывающей клеточной линии, включают, например, клетки CHO, клетки ВНК, клетки MDCK, клетки C3H 10T1/2, клетки FLY, клетки Psi-2, клетки BOSC 23, клетки P A317, клетки WENI, клетки COS, клетки BSC 1, клетки BSC 40, клетки BMT 10, клетки VERO, клетки W138, клетки MRC5, клетки A549, клетки НТ1080, клетки 293, клетки 293Т, клетки В-50, клетки 3Т3, клетки NIH3Т3, клетки HepG2, клетки Saos-2, клетки Huh7, клетки HeLa, клетки W163, клетки 211 и клетки 211А.

[0228] Используемый в настоящем документе термин «клеточная линия-производитель» относится к клеточной линии, которая способна продуцировать рекомбинантные ретровирусные частицы, содержащие упаковывающую клеточную линию и конструкт вектора переноса, содержащий упаковывающий сигнал. Получение инфекционных вирусных частиц и вирусных маточных растворов можно осуществлять с использованием традиционных методов. Способы получения маточных вирусных растворов известны в данной области и проиллюстрированы, например, в Y. Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:628–633, and N. R. Landau et al. (1992) J Virol. 66:5110–5113. Инфекционные вирусные частицы могут быть собраны из упаковывающих клеток с использованием традиционных методик. Например, инфекционные частицы могут быть собраны путем лизиса клеток или сбора супернатанта клеточной культуры, известных в данной области. При необходимости собранные вирусные частицы могут быть необязательно очищены. Подходящие методики очистки хорошо известны специалистам в данной области.

[0229] Доставка гена(ов) или другой полинуклеотидной последовательности с помощью ретровирусного или лентивирусного вектора посредством вирусной инфекции, а не путем трансфекции, называется «трансдукцией». В одном варианте осуществления ретровирусные векторы трансдуцируются в клетку посредством инфекции и интеграции провируса. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень, например Т-клетка, является «трансдуцированной», если она содержит ген или другую полинуклеотидную последовательность, доставленную в клетку путем заражения вирусным или ретровирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления трансдуцированная клетка содержит один или более генов или других полинуклеотидных последовательностей, доставляемых ретровирусным или лентивирусным вектором в ее клеточный геном.

[0230] В некоторых вариантах осуществления описаны клетки-хозяева, экспрессирующие один или более конструктов согласно настоящему изобретению (например, анти-CD19

CAR). Клетки-хозяева можно вводить субъекту для лечения и/или профилактики Т-клеточных злокачественных образований. Другие способы, относящиеся к применению вирусных векторов в генной терапии, которые можно использовать в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего описания, можно найти, например, в Kay, M.A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.): 138S–142S; Ferry, N. and Heard, J.M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975–81; Shiratory, Y. et al., (1999) *Liver* 19:265–74; Oka, K. et al., (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179–86; Thule, P. M. and Liu, J.M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744–52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335–56; Alt, M. (1995) *J Hepatol.* 23:746–58; Brody, S. L. and Crystal, R.G. (1994) *Ann. NY Acad. Sci.* 716:90–101; Strayer, D.S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159–2172; Smith–Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43–49; and Lee, H. C. et al., (2000) *Nature* 408:483–8.

[0231] Помимо введения CAR сконструированные Т-клетки по данному изобретению можно дополнительно сконструировать для уменьшения и/или устранения экспрессии TCR α и B2M, например, с использованием одного или более ZFN или CRISPR/sgRNA, которые нацелены на гены TRAC и B2M. Следует понимать, что потомки клеток, нацеленных на ZFN, сами по себе могут не содержать молекулу, полинуклеотиды и/или векторы, описанные в настоящем документе, но в этих клетках инактивируют ген TCR и/или B2M.

[0232] Композиции, описанные в настоящем документе, могут содержать Т-клеточные композиции, как предусмотрено в настоящем документе. Один вариант осуществления, описанный в настоящем документе, представляет собой композицию, содержащую модифицированную Т-клетку, которая экспрессирует анти-CD19 CAR, причем экспрессия, такая как обнаруживаемая поверхностная экспрессия TCR и B2M, была снижена и/или устранена. Композиции включают, но не ограничиваются ими, фармацевтические композиции. «Фармацевтическая композиция» относится к композиции, составленной в фармацевтически приемлемых или физиологических растворах, приемлемых для введения в клетку или животное, отдельно или в комбинации с одним или более другими способами терапии. Также следует понимать, что при необходимости композиции по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с другими агентами, например, цитокинами, факторами роста, гормонами, малыми молекулами, химиотерапевтическими, пролекарственными средствами, лекарственными средствами, антителами или другими различными фармацевтическими активными веществами. Практически нет ограничений на другие компоненты, которые также могут быть включены в композиции, при условии, что дополнительные агенты не оказывают негативного влияния на способность композиции доставлять целевое терапевтическое средство.

[0233] Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые в рамках здравого медицинского заключения подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других проблем или осложнений, соразмерных с разумным соотношением польза/риск.

[0234] В контексте настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент» включает, помимо прочего, любой адъювант, носитель, эксципиент, глидант, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель, усилитель вкуса, поверхностно-активное вещество, смачивающий агент, диспергирующий агент, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель, поверхностно-активное вещество или эмульгатор, который был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США как приемлемый для использования на людях или домашних животных. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, но не ограничиваются ими, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетатцеллюлоза; трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао, воски, животные и растительные жиры, парафины, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, оксид цинка; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и другие совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

[0235] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, композиции по настоящему изобретению содержат количество модифицированных Т-клеток, предусмотренных в настоящем документе. По существу, можно сказать, что фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки, рассматриваемые в настоящем документе, может быть введена в дозе от 10^2 до 10^{10} клеток/кг массы тела, от 10^5 до 10^9 клеток/кг массы тела, от 10^5 до 10^8 клеток/кг массы тела, от 10^5 до 10^7 клеток/кг массы тела, от 10^7 до 10^9 клеток/кг массы тела или от 10^7 до 10^8 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Количество клеток будет зависеть от конечного применения композиции, а также от типа входящих в нее клеток. Т-клетки,

модифицированные для экспрессии сконструированного TCR или CAR, можно вводить многократно в дозах в пределах этих диапазонов. Клетки могут быть аллогенными, сингенными, ксеногенными или аутологичными для пациента, проходящего терапию. При необходимости лечение может также включать введение митогенов (например, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL-12, TNF-альфа, IL-18 и TNF-бета, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α и т. д.), как описано в настоящем документе, для улучшения приживления и функционирования влитых Т-клеток.

[0236] Как правило, композиции, включающие активированные и расширенные клетки, как описано в настоящем документе, могут быть использованы для лечения и профилактики заболеваний, возникающих у людей с ослабленным иммунитетом или иммуносупрессией. В некоторых случаях композиции, включающие модифицированные Т-клетки, рассматриваемые в настоящем документе, используются для лечения раковых заболеваний. Модифицированные Т-клетки, описанные в настоящем документе, можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в сочетании с носителями, разбавителями, вспомогательными веществами и/или с другими компонентами, такими как IL-2, IL-7 и/или IL-15 или другие цитокины или клеточные популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, рассматриваемые в настоящем документе, включают определенное количество генетически модифицированных Т-клеток, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

[0237] Фармацевтические композиции, включающие модифицированные Т-клетки, рассматриваемые в настоящем документе, могут дополнительно включать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, фосфатно-буферный солевой раствор и тому подобное; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстран, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему описанию могут быть предназначены для парентерального введения, например внутрисосудистого (внутривенного или внутриартериального), внутрибрюшинного или внутримышечного введения.

[0238] Жидкие фармацевтические композиции, будь то растворы, суспензии или другие подобные формы, могут включать одно или более из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, такой как физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, фиксированные масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или

суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для корректировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика. Также включены стерильные инъекционные фармацевтические композиции.

[0239] В некоторых вариантах осуществления композиции, рассматриваемые в настоящем документе, содержат эффективное количество расширенной модифицированной композиции Т-клеток, отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими агентами. Таким образом, композиции Т-клеток можно вводить отдельно или в комбинации с другими известными видами лечения рака, такими как лучевая терапия, химиотерапия, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т. д. Композиции также можно вводить в комбинации с антибиотиками и противовирусными агентами. Такие терапевтические агенты могут быть приняты в данной области в качестве лечения болезненного состояния, как описано в настоящем документе, такого как рак. В одном варианте осуществления композиции, рассматриваемые в настоящем документе, также можно вводить с ингибиторами TGF- β , например низкомолекулярным ингибитором LY55299. Примеры предполагаемых терапевтических агентов включают цитокины, факторы роста, стероиды, NSAID, DMARD, противовоспалительные, химиотерапевтические, радиотерапевтические, терапевтические антитела или другие активные и вспомогательные агенты.

[0240] В определенных вариантах осуществления композиции, включающие Т-клетки, рассматриваемые в настоящем документе, могут применяться в сочетании с любым количеством химиотерапевтических агентов. Иллюстративные примеры химиотерапевтических агентов включают в себя, без ограничений, алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилентиофосфорамида и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтамينا оксида, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацил иприт; нитромочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин,

ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабин, карминомицин, карзинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, 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, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства, угнетающие функцию надпочечников, такие как аминоклоротетимид, митоган, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльформитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; галлия нитрат; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая 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 Oncology, г. Принстон, штат Нью-Джерси) и доксетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Roger, г. Антони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, например, 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 RPS 2000; дифторметилометин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Targretin™ (бексаротен), Panretin™ (алитретиноин); ONTAK™ (денилейкин дифтитокс); эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных. В это определение также включены антигормональные агенты, действие которых направлено на регулирование или ингибирование действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен,

ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных.

[0241] Различные другие терапевтические средства могут быть использованы в сочетании с композициями, описанными в данном документе. В одном варианте осуществления композиция, содержащая Т-клетки, вводится с противовоспалительным агентом. Противовоспалительные средства или лекарственные средства включают, без ограничения, стероиды и глюкокортикоиды (включая бетаметазон, будесонид, дексаметазон, ацетат гидрокортизона, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные средства (НПВП), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуноמיד, лекарственные против TNF, циклофосфамид и микофенолат.

[0242] В некоторых вариантах осуществления НПВП выбирают из группы, состоящей из ибупрофена, напроксена, напроксена натрия, ингибиторов ЦОГ-2, таких как VIOXX® (рофекоксиб) и CELEBREX® (целекоксиб), и салилатов. Иллюстративные анальгетики выбраны из группы, состоящей из ацетаминофена, оксикодона, трамадола или гидрохлорида пропороксифенена. Примеры глюкокортикоидов выбраны из группы, состоящей из кортизона, дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона или преднизона. 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 болезнь-модифицирующих антиревматических препаратов (DMARD) включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуноמיד, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (перорально (ауранофин) и внутримышечно) и миноциклин.

[0243] В других вариантах осуществления терапевтические антитела, подходящие для комбинации с CAR-модифицированными Т-клетками, рассматриваемыми в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, абаговомаб, адекватумумаб, афутузумаб, алемтузумаб, алтумумаб, аматуксимаб, анатумумаб, аркитумумаб, бавитуксимаб, бектумумаб, бевацизумаб, биватузумаб, блинатумумаб, брентуксимаб, кантузумаб, катумаксамаб, цетуксимаб, цитатузумаб, циксутумумаб, кливатузумаб, конатумумаб, даратумумаб, дрозитумаб, дулиготумаб, дусигитумаб, детумомаб, дацетузумаб,

далотузумаб, экроексимаб, элотузумаб, энситуксимаб, эртумаксумаб, этарацизумаб, фариетузумаб, фиклатузумаб, фигитумаб, фланвотумаб, футуксимаб, ганитумаб, гемтузумаб, гирентуксимаб, глембатумаб, ибритумомаб, иговомаб, имгатузумаб, индатуксимаб, инотузумаб, интетумумаб, ипилимумаб, иратумумаб, лабетузумаб, лексатумумаб, линтузумаб, лорвотузумаб, лукатумумаб, мапатумумаб, матузумаб, милатузумаб, минретумомаб, митумомаб, моксетумомаб, наматумаб, наптумомаб, нецитумомаб, нимотузумаб, нофетумомаб, окаратузумаб, офатумумаб, оларатумаб, онартузумаб, опортузумаб, ореговомаб, панитумумаб, парсатузумаб, патритумаб, пемтумомаб, пертузумаб, пинтумомаб, притумумаб, ракотумомаб, радретумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, робатумумаб, сатумомаб, сибротузумаб, силтуксимаб, симтузумаб, солитомаб, такатузумаб, таплитумомаб, тенатумомаб, тепротумумаб, тигатузумаб, тоситумомаб, трастузумаб, тукотузумаб, ублитуксимаб, велтузумаб, ворсетузумаб, вотумумаб, залутумумаб, СС49 и 3F8.

[0244] В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, вводят в сочетании с цитокином. В контексте данного документа термин «цитокин» является общим термином для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины, хемокины и традиционные полипептидные гормоны. Цитокины включают гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионилловый гормон роста человека и бычий гормон роста; паратгормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста печени; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; мюллеров ингибирующий фактор; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, 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); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 α , 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- α или TNF- β ; и другие полипептидные факторы, включая лиганд LIF и лиганд kit (KL). В контексте данного документа термин «цитокин» включает белки из природных источников

или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты цитокинов нативной последовательности.

[0245] Любая клетка может быть использована в качестве клетки-хозяина для полинуклеотидов, векторов или полипептидов согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка может представлять собой прокариотическую клетку, грибковую клетку, дрожжевую клетку или более высокие эукариотические клетки, такие как клетка млекопитающего. Подходящие прокариотические клетки включают, без ограничений, эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например *Enterobactehaceae*, такие как *Escherichia*, например *E. coli*; *Enterobacter*; *Ernoni*; *Klebsiella*; *Proteus*; *Salmonella*, например *Salmonella typhimurium*; *Serratia*, например *Serratia marcescans* и *Shigella*; *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*; *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*; и *Streptomyces*. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку.

[0246] В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, инфильтрующей опухоль лимфоцита (ТИЛ), клетки, экспрессирующей TCR, природной клетки-киллера (NK), дендритной клетки, гранулоцита, врожденной лимфоидной клетки, мегакариоцита, моноцита, макрофага, тромбоцита, тимоцита и миелоидной клетки. В одном варианте осуществления иммунная клетка представляет собой сконструированную аллогенную Т-клетку. В отличие от терапии антителами или отдельно CAR-модифицированными Т-клетками, Т-клетки (или любые клетки, как описано выше), модифицированные для экспрессии анти-CD19 CAR, способны реплицироваться *in vivo* и, таким образом, способствовать долгосрочной устойчивости, которая может приводить к непрерывной терапии рака.

[0247] В другом варианте осуществления Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR, могут подвергаться экспансии Т-клеток таким образом, что популяция терапевтических Т-клеток может оставаться или сохраняться в течение продолжительного периода времени. Таким образом, другой вариант осуществления, описанный в настоящем документе, представляет собой способ размножения популяции Т-клеток, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества Т-клеток, описанных в настоящем документе.

[0248] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, популяция Т-клеток остается в диапазоне от около 50% до около 100% через 7 дней, от около 60% до около 90% через 7 дней или от около 70% до около 80% через 7 дней. В другом варианте осуществления, описанном в настоящем документе, популяция Т-клеток остается около

50% через 7 дней, около 60% через 7 дней, около 70% через 7 дней, около 80% через 7 дней, около 90% через 7 дней или около 100% через 7 дней.

[0249] В другом варианте осуществления описан способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение эффективного количества, например терапевтически эффективного, количества композиции, включающей Т-клетки, экспрессирующие CAR, как описано в настоящем документе. Количество и частота введения препарата определяются такими факторами, как состояние пациента, тип и тяжесть его заболевания, хотя соответствующие дозировки могут быть определены в ходе клинических исследований.

[0250] В другом варианте осуществления описан способ лечения рака печени у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение эффективного количества, например терапевтически эффективного количества композиции, включающей Т-клетки, экспрессирующие конструкт CAR, как описано в настоящем документе. Количество и частота введения препарата определяются такими факторами, как состояние пациента, тип и тяжесть его заболевания, хотя соответствующие дозировки могут быть определены в ходе клинических исследований.

[0251] В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие Т-клетки, генетически модифицируют вектором, содержащим промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим экспрессию CAR, используют для лечения различных видов рака.

[0252] В других вариантах осуществления предусмотрены способы, включающие введение терапевтически эффективного количества модифицированных Т-клеток, описанных в настоящем документе, или композиции, включающей их, пациенту, нуждающемуся в этом, отдельно или в комбинации с одним или несколькими терапевтическими агентами. В определенных вариантах осуществления клетки согласно настоящему изобретению используются для лечения пациентов, подверженных риску развития рака. Таким образом, в настоящем описании предложены способы лечения или профилактики рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества модифицированных Т-клеток по данному описанию.

[0253] Специалисту в данной области будет понятно, что для достижения желаемого эффекта может потребоваться многократное введение композиций, описанных в настоящем документе. Например, композицию можно вводить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более раз в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более.

[0254] В определенных вариантах осуществления может быть желательно ввести субъекту активированные Т-клетки, а затем впоследствии провести повторный забор крови (или

аферез), активировать полученные из нее Т-клетки в соответствии с настоящим описанием и повторно ввести пациенту эти активированные и размноженные Т-клетки. Этот процесс можно осуществлять несколько раз каждые несколько недель. В определенных вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы при заборе крови объемом от 10 до 400 куб. см. Не ограничиваясь какой-либо теорией, можно предположить, что использование этого протокола многократного забора крови / многократной повторной инфузии может служить для отбора определенных популяций Т-клеток.

[0255] Введение рассматриваемых в настоящем документе композиций может осуществляться любым удобным способом, в том числе путем аэрозольной ингаляции, инъекции, приема внутрь, трансфузии, имплантации или трансплантации. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят парентерально. Фразы «парентеральное введение» и «введение парентерально», используемые в настоящем документе, относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутрисосудистое, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интратекальное, интракапсулярное, интраорбитальное, интратуморальное, внутрисердечное, внутрикожное, внутрибрюшинное, транстрахеальное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, подкапсулярное, субарахноидальное, интраспинальное и интрастернальное введение и инфузию. В одном варианте осуществления композиции, рассматриваемые в настоящем документе, вводятся субъекту путем прямой инъекции в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

[0256] В одном варианте осуществления субъекту, нуждающемуся в этом, вводят эффективное количество композиции для повышения клеточного иммунного ответа на рак у субъекта. Иммунный ответ может включать клеточные иммунные реакции, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными убивать инфицированные клетки, регуляторными Т-клетками и хелперными Т-клетками. Также может быть индуцирован гуморальный иммунный ответ, опосредованный в основном хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки, что приводит к выработке антител. Для анализа типа иммунного ответа, индуцированного композициями по настоящему описанию, могут быть использованы различные методики, хорошо описанные в данной области; например, *Current Protocols in Immunology*, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

[0257] В случае опосредованного Т-клетками уничтожения связывание CAR-лиганда инициирует передачу сигнала CAR в Т-клетку, что приводит к активации различных сигнальных путей Т-клетки, которые побуждают Т-клетку вырабатывать или

высвобождать белки, способные вызывать апоптоз клеток-мишеней по различным механизмам. Эти механизмы, опосредованные Т-клетками, включают (но не ограничиваются ими) перенос внутриклеточных цитотоксических гранул из Т-клетки в клетку-мишень, секрецию Т-клетками провоспалительных цитокинов, которые могут вызывать гибель клеток-мишеней напрямую (или опосредованно через привлечение других эффекторных клеток-киллеров), и регуляцию лигандов рецепторов гибели (например, FasL) на поверхности Т-клетки, которые вызывают апоптоз клеток-мишеней после связывания с их родственным рецептором гибели (например, Fas) на клетке-мишени.

[0258] В вариантах осуществления описан способ лечения субъекта, у которого диагностирован рак, включающий извлечение Т-клеток у донора, генетическую модификацию указанных Т-клеток вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированную экспрессию конструкторов CAR, описанных в настоящем документе, и, вследствие этого, получение популяции модифицированных Т-клеток и введение модифицированных Т-клеток пациенту, который не является донором.

[0259] Способы введения клеточных композиций, описанных в настоящем документе, включают любой метод, который эффективен для реинтродукции *ex vivo* генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые либо непосредственно экспрессируют сконструированный CAR в субъекте, либо при реинтродукции генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют сконструированные экспрессированные конструкторы анти-CD19 CAR, описанные в настоящем документе.

[0260] Хотя вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно с помощью иллюстраций и примеров для ясности понимания, специалистам в данной области в контексте настоящего описания будет очевидно, что в него могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от духа или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены исключительно в качестве иллюстрации и не имеют ограничительного характера. Специалистам в данной области будет понятно множество не критических параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу аналогичных результатов.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

[0261] ITAM-содержащие домены были выбраны для сигнального домена вместо CD3 дзета в качестве анти-CD19 химерного антигенного рецептора (CAR) следующего

поколения для усиления терапевтического потенциала. Анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR) второго поколения, имеющий анти-CD19 scFv архитектуру, шарнирный домен CD28, трансмембранный домен CD28, костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен CD3дзета, использовали в качестве исходной матрицы для конструирования и синтеза семи «дочерних» конструкторов. Далее эти конструкторы называются CD19-дзета-1xx, CD19-эпсилон, CD19-дельта, CD19-гамма, CD19-Dap12, CD19-дзета-СО (кодон-оптимизированный) и CD19-эпсилон-СО (кодон-оптимизированный). Для получения «дочерних» конструкторов сигнальный домен CD3 дзета в нуклеиновых кислотах 3316–3651 исходной матрицы заменяли следующими последовательностями:

Дзета 1xx:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR
(SEQ ID NO 77).

Эпсилон:

KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGLNQRRI,
(SEQ ID NO 52)

Дельта:

GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO 55).

Гамма:

GQDGVQRSRASDKQTLNPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO 57).

Dap12:

YFLGRLVPRGRGAAEAATRQKQRTETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK, (SEQ ID
NO 59).

Дзета-СО:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
(SEQ ID NO 78).

[0262] Описанные в настоящем документе конструкторы CAR клонировали в лентивирусный вектор (LVV), который включал промотор вируса стволовых клеток мыши (mSCV) для стимуляции конститутивной экспрессии CAR.

[0263] CAR, используемые в следующих примерах, включали сигнальную последовательность CD8a, имеющую анти-CD19 scFv архитектуру, шарнирный домен CD28, трансмембранный домен CD28, костимулирующий домен CD28 и сигнальный домен, как описано выше.

Пример 2

[0264] CAR Т-клетки продукта получали из материала, полученного путем афереза от здоровых людей-доноров. Собранный материал, полученный путем афереза, промывали, инкубировали с магнитными гранулами, связанными с антителом к CD8, и обрабатывали с помощью системы разделения клеток CliniMACS® (Miltenyi Biotech) согласно инструкциям производителя с использованием магнитных гранул, связанных с антителом к CD8, для обогащения CD8⁺ Т-клеток, которые затем криоконсервировали. Полученную отрицательную фракцию промывали и обрабатывали, как описано выше, с использованием магнитных гранул, связанных с антителом к CD4, для обогащения CD4⁺ Т-клетками, которые затем криоконсервировали. Выделенные CD4⁺ и CD8⁺ первичные человеческие Т-клетки размораживали в базальной среде OpTmizer CTST[™] для экспансии Т-клеток с добавлением 2,6% добавки для экспансии Т-клеток OpTmizer CTST[™], 2,5% заменителя иммунных клеток CTS, 1% пенициллин/стрептомицина/L-глутамин и 305 международных единиц/мл человеческого интерлейкина (IL)-2, далее именуется полной средой OpTmizer[™]. Т-клетки ресуспендировали в полной среде OpTmizer[™], содержащей 1,66 мкг/мл антитела к CD28 (клон 28.2) при плотности 1,5 x 10⁶ клеток/мл и затем высевали в колбу Т-75, предварительно покрытую 1,23 мкг/мл антитела к CD3 (клон ОКТ3), чтобы индуцировать активацию Т-клеток (день 0). В день 1 после активации клетки трансдуцировали LVV, кодирующим исходный анти-CD19 CAR, либо использовали дочерние конструкции эpsilon, delta, gamma и Dap12 при множественности заражения (MOI) 20. Дополнительные экспериментальные группы, состоящие из конструкций дзета-СО и эpsilon-СО, трансдуцировали в MOI 5, а нетрансдуцированный (NTD) образец служил отрицательной контрольной пробой. Т-клетки промывали полной средой OpTmizer[™] на день 3, нормализовали и размножали в течение дополнительных 4 дней (от 3 до 7). В момент сбора клеток (день 7) клетки криоконсервировали для будущего применения. В несколько моментов времени во время экспансии (дни 3–7) количество клеток отбирали с использованием Vi-CELL, а плотность клеток нормализовалась до 0,5–1 x 10⁶ клеток/мл путем добавления полной среды OpTmizer[™]. В этих временных точках среднее значение жизнеспособности клеток, диаметр и плотность клеток регистрировали на Vi-CELL.

[0265] Количество клеток, жизнеспособность клеток и диаметр клеток отслеживали с дня 0 по день 7 для каждой из различных экспериментальных групп и обобщали в таблице 6.

Таблица 6. Данные семидневной экспансии трансдуцированных конструкторов												
Экспериментальные группы	Количество клеток (10 ⁶)				Жизнеспособность (%)				Диаметр (мкм)			
	День 0	День 3	День 5	День 7	День 0	День 3	День 5	День 7	День 0	День 3	День 5	День 7
NTD	7,9	8,3	65,6	370,5	96,7	88,6	90,3	93,7	8,6	12,0	12,1	10,8
Дзета	7,9	9,9	78,9	336,9	96,7	87,6	91,9	92,5	8,6	11,4	12,1	11,0
Эпсилон	7,9	7,4	60,0	213,6	96,7	85,9	88,0	89,2	8,6	11,7	12,1	10,9
Дельта	7,9	7,6	63,0	301,3	96,7	87,3	90,1	92,1	8,6	11,8	12,1	11,1
Гамма	7,9	8,8	69,0	331,8	96,7	87,4	90,3	92,1	8,6	11,7	12,2	10,9
Dar12	7,9	7,51	58,3	325,5	96,7	85,6	89,4	92,8	8,6	12,0	12,1	11,0
Дзета-СО	7,9	8,9	59,3	312,4	96,7	89,2	89,6	91,0	8,6	11,8	12,3	11,1
Эпсилон-СО	7,9	8,0	53,2	229,8	96,7	86,4	85,9	80,8	8,6	11,4	12,5	11,2
Дзета 1xx	7,9	8,6	72,4	348,9	96,7	89,6	92,5	93,1	8,62	11,7	12,1	10,9

[0266] Всего $7,9 \times 10^6$ клеток на экспериментальную группу стимулировали в день 0. В конце семидневного процесса получения конструкторы эпсилон, эпсилон СО и CD19-RVV размножали до общего количества клеток по меньшей мере около 200×10^6 . Диаметр клеток продукта используется в качестве косвенной меры измерения активации Т-клеток и не демонстрирует существенных различий между любой из групп во время получения.

Пример 3

[0267] Экспрессию CAR измеряли с помощью проточной цитометрии в дни 6 и 7 для определения эффективности трансдукции CAR Т-клеток продукта. Т-клетки окрашивали панелью антител, конъюгированных с флуорофором, против CD3, CD4, CD8 и линкера Whitlow (CAR) и подвергали анализу с помощью проточной цитометрии для определения эффективности трансдукции и соотношений CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток. Оценку экспрессии CAR (анти-CD19 CAR) выполняли с помощью антитела, конъюгированного с флуорофором, направленного на линкер Whitlow, присутствующий в анти-CD19 scFv. Для обеспечения специфического анализа жизнеспособных клеток также использовали фиксируемый краситель жизнеспособности клеток. Клетки окрашивали путем инкубации с

соответствующей смесью антитела в течение 20 минут при 4 °С с последующими 2 промывками буфером для окрашивания, а затем фиксировали путем инкубации в 0,6% параформальдегида в фосфатно-солевом буферном растворе или сбалансированном солевом растворе Хэнка в течение 10 минут при комнатной температуре. Все данные проточной цитометрии собирали на приборе FACSCanto™ и анализировали данные с использованием программного обеспечения FlowJo.

[0268] Экспрессию CAR измеряли как в день 6, так и на день 7 получения с использованием окрашивания линкера Whitlow и последующего анализа проточной цитометрии (таблица 7). Экспериментальные группы показали сопоставимую экспрессию CAR в день 6 в диапазоне от 81,5% до 91,9% и оставались относительно стабильными в день 7. Единственным исключением был конструкт эпсилон, который имел самую низкую экспрессию CAR в день 6 при 74,2%, а также значительно сниженную до 58,4% в день 7.

Таблица 7. Данные экспрессии трансдуцированных конструкций во время получения				
Экспериментальные группы	% трансдукции			
	День 0	День 3	День 6	День 7
NTD	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Дзета	Н/П	Н/П	81,5	83,9
Эпсилон	Н/П	Н/П	74,2	58,4
Дельта	Н/П	Н/П	91,8	90,4
Гамма	Н/П	Н/П	91,9	89,9
Дар12	Н/П	Н/П	91,7	91,3
Дзета-СО	Н/П	Н/П	89,1	94,3
Эпсилон-СО	Н/П	Н/П	90,3	95,1
Дзета 1xx	Н/П	Н/П	88,2	87,9

Пример 4

[0269] Т-клеточноопосредованную цитотоксичность измеряли как функцию снижения целевого сигнала люциферазы в лунках совместного культивирования по сравнению с сигналом, испускаемым только клетками-мишенями. Т-клеточные продукты, созданные из Т-клеток, полученных путем афереза от здорового донора, криоконсервировали в день сбора (день 7 получения). На день 0 совместного культивирования Т-клеточные продукты размораживали и оставляли в течение ночи в полной среде OpTmizer™ до начала

совместного культивирования с клетками-мишенями. Непосредственно перед началом совместного культивирования аликвоту каждого образца Т-клеток инкубировали с панелью антител-флуорофоров против CD3, CD4, CD8 и линкера Whitlow (CAR) и анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки эффективности трансдукции. Общую эффективность трансдукции оценивали с помощью специально изготовленного антитела, которое связывает линкер Whitlow между тяжелой и легкой цепями одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv). Затем Т-клетки маркировали реагентом CellTrace™ Violet (CTV), после чего промывали с помощью R-10% среды [среды RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина-стрептомицина, L-глутамин и HEPES]. Часть CTV-меченных образцов фиксировали и хранили при 4 °C до дня 4, когда образцы анализировали параллельно с образцами совместного культивирования дня 4 с помощью проточной цитометрии для оценки начальных уровней сигнала CTV (CTV Max). Т-клеточные продукты и клетки-мишени, экспрессирующие люциферазу, высевали вместе при различных соотношениях эффектора к мишени (E : T) в диапазоне от 3 : 1 до 1 : 243 в среде R-10% (день 0 совместного культивирования). Т-клеточные продукты последовательно разбавляли в 3 раза, а количество клеток-мишеней на лунку поддерживали постоянным при 20 000 клеток. Положительные клетки-мишени включали Nalm6 (CD19+) и ST486 (CD19+). В качестве контроля, Т-клеточные продукты культивировали в отсутствие каких-либо клеток-мишеней (т. е. только Т-клетки) для оценки базальных уровней Т-клеточной функции в отсутствие стимуляции антигена. Сокультуры инкубировали при 37 °C в течение 1 или 4 дней, а функциональные оценки проводили, как описано ниже.

[0270] После того, как образцы оттаивали и оставляли на ночь, образец каждой экспериментальной группы окрашивали на CD3, CD4, CD8 и линкер Whitlow (CAR) для оценки их процентного выхода и экспрессии CAR. Затем группы нормализовали до самого низкого процента трансдукции (43,7%) путем добавления NTD-клеток. Это делали для обеспечения того, чтобы все образцы имели одинаковое количество CAR+ в последующих анализах. Клетки продукта успешно нормализовали и поддерживали в диапазоне от 41,0 до 46,8 процента (таблица 8). Было отмечено, что конструкт эILON дезактивирует CAR на клеточной поверхности, и обнаружено снижение до 27,7% CAR+ ко времени начала совместного культивирования с клетками-мишенями.

Таблица 8. Подготовка экспрессии CAR T-клеток продукта на день 0 совместного культивирования		
Эксперименталь- ные группы	% трансдукции	
	Пре- нормализация / выдерживание в течение ночи	Пост-нормализация
NTD	Н/П	Н/П
Дзета	83,4	41,9
Эпсилон	43,7	27,7
Дельта	86,4	42,1
Гамма	85,7	41,0
Dap12	88,1	43,1
Дзета-СО	93,7	42,5
Эпсилон-СО	94,1	43,6
Дзета 1xx	87,1	43,8

[0271] Т-клеточноопосредованную цитотоксичность измеряли как функцию снижения целевого сигнала люциферазы в лунках совместного культивирования по сравнению с сигналом, испускаемым только клетками-мишенями. На дни 1 и 4 после начала совместного культивирования в лунки для совместного культивирования добавляли субстрат D-люциферин в конечной концентрации 0,14 мг/мл, и планшеты инкубировали при 37 °С в темноте в течение 10 минут. Затем сразу считывали люминесцентный сигнал на мультимодальном микропланшетном фотометре VarioSkan™ LUX или VarioSkan® Flash. Т-клеточноопосредованную цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

% цитотоксичности = $[1 - \text{сигнал люциферазы (интересующего образца / только контроля мишени)}] * 100$

[0272] Данные, полученные на день 1 (таблица 9) и на день 4 (таблица 10), демонстрировали эквивалентную дозозависимую цитотоксичность одновременно по всем антигенэкспрессирующим клеточным линиям (Nalm6 и ST486) без существенных различий между конструктами.

Таблица 9.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	17,1	5,2	-0,1	7,8	-0,1	0,1	-5,3
	18,5	0,4	-0,3	12,5	-1,8	1,3	-1,5
	11,5	8,9	4,0	5,0	6,3	3,6	-3,1
Дзета	92,4	64,3	27,1	19,1	-0,6	-6,6	-7,6
	92,8	64,8	29,6	22,5	-4,4	0,0	-0,1
	91,5	59,2	33,4	15,8	20,1	2,1	0,1
Эпсилон	90,5	59,6	27,6	18,5	1,2	-0,5	-3,6
	91,7	59,4	21,0	17,0	1,9	-2,1	-6,0
	90,7	62,5	37,0	14,9	20,2	15,9	14,8
Дельта	78,4	45,1	25,1	17,4	0,0	2,5	0,9
	79,1	42,4	21,2	16,7	1,0	0,2	-3,4
	75,5	47,6	24,8	10	20	16,3	13,4
Гамма	73,4	44,3	23,2	14,9	2,1	1,6	-3,8
	74,7	40,5	16,3	17,9	0,8	0,7	0,0
	70,1	40,0	24,0	12,6	6,7	3,0	4,2
Дар12	83,2	51,6	29,2	21,5	5,8	-1,0	-3,9
	82,3	46,2	22,2	20,1	3,0	1,2	0,7
	81,2	48,3	22,6	12,0	13,8	3,3	2,6
Дзета-СО	94,5	74,2	41,8	25,7	3,9	3,7	-1,8
	96,4	68,3	34,6	23,5	5,9	3,4	-1,1
	93,4	70,0	34,4	21,0	3,1	0,4	1,5
Эпсилон-СО	89,3	54,5	24,3	21,9	4,6	6,1	-0,6
	86,1	50,3	23,5	20,4	3,7	0,1	2,6
	88,8	46,3	26,8	13,8	5,5	5,3	0,0
Дзета 1xx	88,9	59,2	27,0	18,4	-0,8	-1,1	-1,8
	87,6	56,0	21,3	17,9	-2,4	-2,7	-0,2
	85,2	55,7	37,7	15,0	14,4	20,3	19,0

Таблица 10.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	60,3	20,4	7,1	-1,8	-1,3	-6,8	0,6
	57,8	20,9	4,9	-2,5	-4,2	-4,1	-0,9
	64,9	16,6	-2,7	-3,2	-2,3	-5,6	-0,2
Дзета	100,1	100,1	97,2	77,9	43,6	21,3	6,9
	100,1	99,9	95,7	73,3	37,3	18,1	8,8
	100,1	100,1	98,2	79,8	37,2	16,1	6,2
Эпсилон	100,1	100,1	98,2	59,3	11,4	-1,6	-6,3
	100,1	100,1	96,5	46,1	13,9	-0,9	1,6
	100,1	100,1	98,2	58,1	13,4	-1,7	-3,3
Дельта	100,1	100,1	98,0	64,0	30,6	4,0	-2,3
	100,1	100,1	96,4	62,5	25,1	7,3	5,5
	100,1	100,1	97,5	64,9	27,8	6,9	2,4
Гамма	100,1	100,1	96,2	61,4	25,9	4,6	-1,0
	100,1	100,0	94,0	60,4	20,6	6,1	0,1
	100,1	100,1	96,4	62,7	23,0	3,3	-1,4
Дар12	100,1	100,1	98,1	73,8	33,7	4,2	-1,0
	100,1	100,1	96,7	68,6	26,8	4,0	3,5
	100,1	100,1	98,9	73,1	28,6	-1,8	-0,3
Дзета-СО	100,1	100,1	99,9	85,0	42,5	9,5	1,8
	100,1	100,1	99,4	81,3	40,6	14,7	2,6
	100,1	100,1	99,5	84,9	46,3	11,8	-0,1
Эпсилон-СО	100,1	100,0	97,5	61,2	27,0	5,1	-1,8
	100,1	99,9	96,4	58,2	26,9	6,4	-2,6
	100,0	100,0	96,9	62,4	27,0	0,3	0,1
Дзета 1xx	100,1	100,1	97,5	68,6	36,8	6,8	5,2
	100,1	100,1	94,3	63,7	23,3	13,3	5,3
	100,1	100,1	97,8	67,2	34,5	10,0	5,2

Пример 5

[0273] На день 1 после начала совместного культивирования, как описано в предыдущем примере, супернатанты собирали и анализировали на уровни цитокинов с использованием набора провоспалительной панели 1 (человек) Meso Scale Discovery V-PLEX® в соответствии с инструкциями производителя. В частности, супернатанты из совместных культур Т-клеточных продуктов, которые высевали при соотношении Е : Т 1 : 1 с антигенэкспрессирующим Nalm6 и ST486, анализировали на уровни интерферона гамма (IFN- γ), IL-2 и секреции фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), опосредованной антигеном. Супернатанты из Т-клеток, культивируемых в отсутствие клеток-мишеней (только Т-клетки), анализировали параллельно для оценки базальных уровней продукции цитокинов в отсутствие антигена. Все образцы разводили так, чтобы они оставались в пределах диапазона обнаружения.

[0274] Супернатант собирали из соотношения Е : Т 1 : 1 и анализировали с помощью MSD на секрецию IFN- γ , IL-2 и TNF- α . Анализ показал, что все конструкторы секретировали цитокины при совместном культивировании с антигенэкспрессирующими клеточными линиями Nalm6 и ST486 (таблица 11). Все они — дзета 1хх, эпсилон-СО и в определенной степени дельта — секретировали сопоставимые высокие уровни провоспалительных цитокинов по сравнению с эталонными контролями дзета и дзета-СО. Эпсилон, гамма и Dap12 продуцировали более низкие уровни цитокинов по сравнению с эталонными контролями дзета и дзета-СО. Совместное культивирование с клеточной линией Nalm6 вызывало более высокие уровни цитокинов по сравнению с уровнями, секретлируемыми клеточной линией ST486, однако общая иерархическая картина конструкторов была постоянной в обеих клеточных линиях. С другой стороны, контрольная группа NTD не секретировала какие-либо измеряемые или значительные уровни цитокина при культивировании отдельно или с антигенэкспрессирующими клеточными линиями.

Таблица 11.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1: анализ цитокинов IFN-γ, TNF-α, IL-2 в клеточных линиях Nalm6 и ST486 с помощью MSD							
Экспериментальные группы	Цитокины	Nalm6	% CV	ST486	% CV	Только Т-клетки	% CV
NTD	IFN- γ	720,2	28,8	1289,0	24,1	16,9	0,0

Таблица 11.

Данные определения функциональных характеристик на день 1: анализ цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-2 в клеточных линиях Nalm6 и ST486 с помощью MSD

Экспериментальные группы	Цитокины	Nalm6	% CV	ST486	% CV	Только Т-клетки	
						Т-клетки	% CV
	TNF- α	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	IL-2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Дзета	IFN- γ	96 335,4	20,9	27 645,8	15,0	200,9	0,0
	TNF- α	1394,4	12,0	424,3	15,6	0,0	0,0
	IL-2	1857,6	10,8	275,0	27,0	0,0	0,0
Эпсилон	IFN- γ	40 251,9	28,0	14 887,6	11,6	126,8	0,0
	TNF- α	495,8	14,0	226,2	10,8	0,0	0,0
	IL-2	217,6	1,5	62,4	23,8	0,0	0,0
Дельта	IFN- γ	58 829,3	20,0	16 827,2	5,3	60,8	0,0
	TNF- α	1071,2	7,7	338,2	9,9	0,0	0,0
	IL-2	1189,5	5,2	148,0	15,3	0,0	0,0
Гамма	IFN- γ	37 352,4	19,5	8944,0	3,9	47,3	0,0
	TNF- α	582,5	3,6	136,9	7,0	0,0	0,0
	IL-2	418,6	7,9	29,1	26,2	0,0	0,0
Дар12	IFN- γ	44 462,9	20,6	12 763,5	7,9	67,3	0,0
	TNF- α	625,8	3,5	171,9	10,7	0,0	0,0
	IL-2	467,8	9,0	47,7	48,1	0,0	0,0
Дзета-СО	IFN- γ	101 222,2	20,4	31 320,8	4,0	67,3	0,0
	TNF- α	1310,0	5,7	442,6	2,1	0,0	0,0
	IL-2	1559,1	3,7	247,9	18,0	0,0	0,0
Эпсилон-СО	IFN- γ	81 122,0	20,3	27 685,4	3,3	148,8	0,0
	TNF- α	857,5	9,8	374,9	3,6	0,0	0,0
	IL-2	1180,8	11,1	257,8	7,2	0,0	0,0
Дзета 1xx	IFN- γ	80 623,9	26,4	22 041,0	5,4	175,2	0,0
	TNF- α	1126,6	11,4	352,4	3,6	0,0	0,0
	IL-2	1493,0	15,3	227,7	12,3	0,0	0,0

Пример 6

[0275] На день 4 после начала совместного культивирования собирали Т-клеточные продукты, которые были высеяны на планшет в соотношении Е : Т 1 : 1, с клетками-мишенями, окрашивали с помощью панели антител-флуорофоров для идентификации Т-клеток и анализировали с помощью проточной цитометрии. Пролиферативную способность Т-клеточных продуктов определяли с помощью проточной цитометрии обусловленного делением клеток разведения красителя СТВ в ответ на антигенэкспрессирующие клетки-мишени по сравнению с клетками-мишенями Т-клеточных продуктов, которые были культивированы отдельно (только Т-клетки), которые использовали для оценки базальных уровней гомеостатической пролиферации в отсутствие стимулов. СТВ-меченные Т-клетки, которые фиксировали в день подготовки совместного культивирования (СТВ Max), анализировали с помощью проточной цитометрии параллельно для оценки интенсивности исходного сигнала СТВ до пролиферации клеток.

[0276] Для оценки пролиферации использовали разведение метки Cell Trace Violet (CTV). Когда CAR-T-клетки делятся, каждое деление разводит краситель и, таким образом, более низкий MFI СТВ по сравнению с клетками в день 0 указывает на пролиферацию. Минимальная гомеостатическая или антиген-независимая пролиферация наблюдается в контрольной группе NTD при культивировании отдельно или с антигенэкспрессирующими клеточными линиями. Все другие конструкции показали сопоставимые уровни MFI при культивировании в сопоставлении с клеточной линией ST486. При культивировании с клеточной линией Nalm6 дзета-СО и эпсилон имели самый низкий MFI СТВ, что указывает на большую пролиферацию. Все остальные конструкции имели сопоставимые уровни пролиферации по сравнению с этой же линией мишени. Полная сводная информация приведена в таблице 12.

Таблица 12.			
Данные определения функциональных характеристик на день 4: анализ пролиферации клеточных линий Nalm6 и ST486 с помощью Cell Trace Violet (CTV). Указанные значения представляют собой медиану кривых распределения СТВ			
Экспериментальные группы	Nalm6	ST486	Только Т-клетки
NTD	19 120	15 672	19 256

Таблица 12.

Данные определения функциональных характеристик на день 4: анализ пролиферации клеточных линий Nalm6 и ST486 с помощью Cell Trace Violet (CTV). Указанные значения представляют собой медиану кривых распределения CTV

Экспериментальные группы	Nalm6	ST486	Только Т-клетки
Дзета	5762	4997	17 367
Эпсилон	4193	5257	11 481
Дельта	5874	6186	16 613
Гамма	6418	7869	20 137
Dap12	5725	7365	17 696
Дзета-СО	3441	4211	15 277
Эпсилон-СО	5812	5103	21 260
Дзета 1xx	5427	5359	18 286

Пример 7

[0277] Для исследований *in vivo* за один день до инъекции получали продукт анти-CD19 CAR Т-клеток, как описано выше, извлекали из криохранилища, размораживали на водяной бане при 37 °С и ресуспендировали в предварительно нагретой полной среде OpTmizer™. Аликвоту суспензии клеток разводили трипановым синим и клетки подсчитывали вручную. Клеточные суспензии центрифугировали при 400 × g в течение 5 минут при комнатной температуре и супернатант аспирировали. Затем клетки ресуспендировали при 2,0–5,0 × 10⁶ клеток/мл в полной среде OpTmizer™ и культивировали в течение ночи в инкубаторе при 37 °С/5% CO₂. В день инъекции NTD Т-клетки объединяли с CAR+ Т-клетками в соотношениях, указанных для нормализации тестовых групп по общему количеству клеток. Аликвоту гомогенной суспензии клеток разводили раствором трипанового синего, а клетки подсчитывали вручную с использованием гемоцитометра для определения жизнеспособности клеток до инъекции. Затем суспензии клеток центрифугировали при 200 x g в течение 10 минут при 4 °С. Супернатанты из каждого флакона аспирировали и клеточные осадки ресуспендировали в DPBS при комнатной температуре. Были протестированы две дозы CAR Т-клеток: 5,0 × 10⁵ и 2,0 × 10⁶ CAR+ клеток на группу. После имплантации аликвоту оставшихся клеток из каждой суспензии разводили раствором трипанового синего и подсчитывали для определения жизнеспособности клеток после имплантации.

[0278] Одинаковое общее количество Т-клеток ($2,4 \times 10^6$ клеток) вводили мышам в каждой из экспериментальных групп. Дозы, подлежащие введению каждой экспериментальной группе, нормализовали для доставки одного и того же общего количества Т-клеток в каждой группе на основе эффективности трансдукции анти-CD19 CAR.

[0279] BLI *in vivo* проводили с использованием системы оптической визуализации IVIS 5. Животных визуализировали под газовым наркозом примерно от 1% до 2% изофлурана. Каждой мышке вводили в/б 0,2 мл/20 г D-люциферина и визуализировали в положении на животе, затем в положении на спине в течение 10 минут после инъекции. Использовали большую сортировку чипа прибора с зарядовой связью (CCD), при этом время воздействия регулировали для получения по меньшей мере нескольких сотен отсчетов от метастатических опухолей, которые наблюдались у каждой мыши на изображении, и чтобы предотвратить насыщение чипа CCD. Изображения BLI собирали на дни 6, 13, 20, 27, 34, 41 и 48. Изображения анализировали с использованием программного обеспечения Living Image версии 4.7.1. Интересующие области (ROI) фиксированного объема всего тела помещали на изображения в положении лежа на животе и на спине для каждого отдельного животного и маркировали на основе идентификации животных. Вычисляли общий поток (фотоны/секунду) и экспортировали для всех ROI, причем написанный пользователем сценарий представлял в табличной форме различные сигналы, обнаруженные для каждой мыши, для облегчения анализа между группами. Представляющие интерес области в положении на животе и на спине суммировали вместе для оценки опухолевой нагрузки всего тела.

[0280] BLI для каждой экспериментальной группы обобщали в таблице 13. В группах, получавших либо контрольный носитель, либо NTD клетки, рост опухолей был неконтролируемым, и обе группы подвергли эвтаназии на день 20 из-за высокой опухолевой нагрузки. Все конструкты с высокой дозой показали значительную и сопоставимую эффективность на день 13. Потеря контроля роста опухоли в группах с высокой дозой начиналась уже на день 20. Эпсилон-СО, Dap12 и дзета 1XX групп с высокой дозой сохранили контролируемый рост опухолей до завершения исследования на день 48.

[0281] Контроль роста опухолей в группах с низкой дозой был более варибельным с начала исследования. Дзета 1xx характеризовался наилучшим контролем роста опухолей на ранних стадиях и сохранял свою эффективность на протяжении всего исследования. Эпсилон-СО продемонстрировал минимальный контроль роста опухолей в первых трех считываниях, но затем продемонстрировал резкий и полный контроль роста опухолей на день 27 у всех мышей, который сохранялся в течение оставшейся части исследования. Эпсилон продемонстрировал аналогичный контроль роста опухолей на поздней стадии на

день 34 у трех из пяти мышей, который продолжался до конца исследования. Остальные две в конечном итоге подвергались эвтаназии из-за высокой опухолевой нагрузки. Несмотря на большую вариабельность, Dap12 продемонстрировал аналогичную эффективность контроля опухоли в низкой дозе, как это было в исследовании с высокой дозой. В частности, у одной мыши наблюдался неконтролируемый рост опухолей с дня 27, но затем контроль восстановился на день 48.

Таблица 13.							
Биолюминесцентная визуализация (BLI) мышей (фотоны/с)							
	День 6	День 13	День 20	День 27	День 34	День 41	День 48
Несущая среда	5,70E+07	2,14E+10	1,56E+11				
	4,96E+07	2,07E+10	1,28E+11				
	5,62E+07	2,26E+10	1,02E+11				
	4,25E+07	2,03E+10	1,34E+11				
	2,61E+07	1,62E+10	9,01E+10				
NTD	5,62E+07	2,19E+10	1,50E+11				
	2,62E+07	1,19E+10	9,40E+10				
	4,92E+07	1,97E+10	1,11E+11				
	4,18E+07	1,78E+10	9,67E+10				
	5,74E+07	1,60E+10	1,27E+11				
Эпсилон (5E5)	3,17E+07	9,08E+06	1,86E+07	1,22E+06	6,94E+05	8,57E+05	8,93E+05
	5,46E+07	1,55E+07	2,81E+08	2,45E+09	8,25E+05	8,94E+05	1,02E+06
	5,94E+07	2,57E+07	8,71E+07	2,56E+09	1,24E+11		
	3,93E+07	5,34E+07	1,30E+09	9,95E+08	1,06E+07	2,70E+07	4,23E+06
	4,42E+07	4,66E+07	5,03E+08	3,32E+09	3,98E+10	9,85E+10	
Дельта (2E6)	5,97E+07	7,89E+05	8,52E+05	7,74E+05	7,64E+05	9,26E+05	2,22E+06
	5,43E+07	8,14E+05	8,03E+05	7,48E+05	7,16E+05	5,97E+05	9,86E+05
	3,73E+07	8,93E+05	7,57E+05	7,99E+05	7,37E+06	1,88E+08	7,91E+09
	3,49E+07	8,59E+05	9,92E+05	8,21E+05	1,01E+06	1,15E+06	1,14E+06
	4,44E+07	8,84E+05	1,46E+06	1,30E+06	5,17E+06	2,13E+07	1,51E+08
Дельта (5E5)	6,25E+07	1,58E+06	1,53E+06	1,55E+06	9,61E+05	7,58E+05	7,34E+05
	5,37E+07	3,33E+07	3,85E+06	5,04E+06	1,58E+08	4,31E+09	2,37E+10
	4,84E+07	1,63E+07	1,19E+08	5,33E+06	1,60E+06	1,43E+07	5,58E+08
	2,96E+07	2,02E+06	9,34E+07	1,85E+09	7,08E+09	1,12E+10	4,70E+10

Таблица 13.							
Билюминесцентная визуализация (BLI) мышей (фотоны/с)							
	День 6	День 13	День 20	День 27	День 34	День 41	День 48
	3,85E+07	5,34E+06	3,09E+06	2,65E+07	6,85E+09	8,03E+08	1,20E+07
Гамма (2E6)	3,85E+07	9,60E+05	7,93E+05	7,37E+05	8,41E+06	1,77E+08	1,11E+10
	6,26E+07	1,04E+06	9,63E+05	7,41E+05	9,52E+05	2,64E+06	7,53E+07
	4,55E+07	8,43E+05	7,65E+05	5,96E+05	1,65E+06	8,39E+05	7,27E+05
	2,97E+07	9,05E+05	7,96E+05	7,40E+05	3,62E+06	1,32E+08	9,97E+09
	5,31E+07	6,22E+05	1,06E+06	7,53E+05	1,14E+06	1,24E+08	6,14E+09
Гамма (5E5)	3,09E+07	5,77E+06	1,71E+07	6,61E+08	1,44E+10	2,43E+10	5,18E+09
	5,28E+07	3,46E+07	1,24E+07	1,55E+08	1,39E+09	2,44E+06	1,38E+06
	6,27E+07	3,04E+07	2,11E+07	8,96E+07	9,76E+07	3,92E+08	2,85E+09
	3,76E+07	2,60E+07	2,10E+08	1,46E+08	8,88E+09	5,52E+10	
	4,60E+07	3,49E+06	4,15E+06	3,32E+07	8,46E+07	3,57E+09	1,62E+10
Dap12 (2E6)	4,67E+07	1,01E+06	9,08E+05	7,37E+05	1,03E+06	1,92E+06	1,05E+06
	3,10E+07	8,80E+05	7,88E+05	7,33E+05	9,11E+05	1,55E+06	7,12E+05
	6,33E+07	9,11E+05	1,23E+06	7,46E+05	7,70E+05	1,67E+06	8,30E+05
	3,70E+07	9,45E+05	8,30E+05	8,39E+05	8,82E+05	1,72E+06	9,20E+05
	5,24E+07	8,75E+05	1,06E+06	8,59E+05	1,13E+06	2,13E+06	8,41E+05
Dap12 (5E5)	3,69E+07	9,94E+05	9,22E+05	7,98E+05	7,52E+05	1,70E+06	9,51E+05
	6,37E+07	3,56E+06	3,15E+06	1,42E+07	1,12E+06	1,68E+06	9,18E+05
	3,12E+07	5,41E+06	3,69E+06	2,80E+08	2,84E+09	1,29E+08	9,88E+05
	5,20E+07	1,23E+06	8,99E+05	7,79E+05	1,09E+07	1,47E+06	5,84E+05
	4,67E+07	1,14E+06	8,74E+05	6,81E+05	7,76E+05	1,54E+06	8,81E+05
Дзета- СО (2E6)	3,62E+07	1,14E+06	1,84E+06	9,89E+06	7,24E+07	5,05E+08	1,01E+06
	2,72E+07	9,86E+05	2,26E+06	5,22E+07	1,10E+10	4,26E+08	3,53E+07
	7,18E+07	2,18E+06	7,91E+05	8,01E+05	1,70E+06	8,12E+07	2,05E+09
	5,10E+07	1,05E+06	1,08E+06	1,21E+06	9,76E+05	1,09E+06	7,52E+05
	4,83E+07	1,43E+06	2,80E+06	5,00E+07	2,36E+08	2,07E+06	1,15E+06
Дзета- СО (5E5)	7,24E+07	2,10E+07	1,19E+07	5,65E+08	2,75E+10	1,19E+08	6,57E+07
	2,67E+07	1,21E+06	8,73E+06	4,56E+08	4,22E+08	1,60E+06	9,52E+05
	3,61E+07	9,48E+06	2,05E+07	8,72E+08	4,24E+09	2,46E+07	5,10E+06
	5,06E+07	5,67E+06	1,38E+07	3,41E+08	2,27E+09	1,15E+09	6,31E+08
	4,11E+07	2,95E+07	2,91E+07	1,60E+09	2,27E+10	9,11E+10	2,80E+10

Таблица 13.							
Билюминесцентная визуализация (BLI) мышей (фотоны/с)							
	День 6	День 13	День 20	День 27	День 34	День 41	День 48
Эпсилон -СО (2Е6)	4,25E+07	1,20E+06	6,99E+05	8,92E+05	9,26E+05	1,09E+06	1,08E+06
	3,57E+07	9,05E+05	7,41E+05	7,97E+05	8,20E+05	1,02E+06	9,12E+05
	5,01E+07	1,11E+06	7,32E+05	8,47E+05	8,07E+05	9,47E+05	1,12E+06
	7,34E+07	8,06E+05	7,28E+05	8,15E+05	8,70E+05	8,80E+05	8,66E+05
	2,90E+07	1,01E+06	7,35E+05	8,70E+05	9,52E+05	1,07E+06	1,02E+06
Эпсилон -СО (5Е5)	3,50E+07	7,97E+08	1,47E+09	1,06E+06	1,18E+06	1,25E+06	1,26E+06
	4,25E+07	3,23E+08	1,47E+09	8,90E+05	9,61E+05	1,10E+06	6,87E+05
	4,92E+07	3,94E+08	4,44E+08	9,13E+05	8,40E+05	1,16E+06	9,43E+05
	2,81E+07	7,75E+07	6,65E+08	8,45E+05	9,78E+05	1,11E+06	1,03E+06
	7,74E+07	1,36E+08	3,30E+08	9,72E+05	9,65E+05	1,27E+06	1,08E+06
Дзета 1хх (2Е6)	5,53E+07	8,26E+05	7,03E+05	6,64E+05	7,29E+05	8,34E+05	8,46E+05
	5,85E+07	7,04E+05	7,94E+05	6,84E+05	7,38E+05	8,70E+05	8,28E+05
	4,05E+07	8,02E+05	8,53E+05	6,34E+05	7,94E+05	7,76E+05	7,06E+05
	4,83E+07	7,98E+05	7,91E+05	7,33E+05	8,15E+05	8,45E+05	9,63E+05
	2,74E+07	8,59E+05	8,38E+05	1,13E+06	8,34E+05	8,70E+05	9,61E+05
Дзета 1хх (5Е5)	5,90E+07	1,57E+06	1,20E+06	2,26E+07	9,42E+05	9,44E+05	9,98E+05
	3,50E+07	2,29E+06	9,56E+05	7,49E+05	8,15E+05	1,08E+06	9,61E+05
	4,41E+07	9,23E+06	2,07E+07	1,77E+07	9,04E+05	9,48E+05	1,03E+06
	3,94E+07	3,50E+06	3,27E+06	1,33E+06	8,11E+05	9,81E+05	7,68E+05
	5,51E+07	5,59E+06	1,45E+06	2,05E+06	7,72E+05	9,54E+05	9,32E+05

Пример 8

[0282] Для *ex vivo* кцПЦР-анализа собирали еженедельный объем крови 100 мкл через ретро-орбитальную пазуху и хранили на льду. Пробы начинали отбирать через 24 часа после инъекции Т-клеток и продолжали еженедельно в течение всей продолжительности исследования в дни 8, 15, 22, 29, 36 и 43. ДНК очищали с использованием KingFisher™ Flex (небольшой объем) в соответствии с инструкциями производителя, затем проводили кцПЦР на очищенной ДНК посредством внутренних протоколов Kite и приборов Bio-Rad.

[0283] Для оценки экспансии и устойчивости CAR Т-клеток *in vivo* периферическую кровь анализировали с помощью кцПЦР на число копий CAR на мкг ДНК (таблица 14). Анализ был ограничен конструктами, которые показали улучшенный контроль опухоли (дзета 1хх,

Dar12 и эпсилон-СО). Дзета демонстрировал незначительную или отсутствующую экспансию в периферической крови мышей, как и ожидалось для нашего стандартного анти-CD19 CAR по данному изобретению в модели опухоли Nalm6. Однако эпсилон-СО и в меньшей степени дзета 1xx и Dar12 демонстрировали увеличение пиковой экспансии и устойчивости CAR Т-клеток в периферической крови мышей при обеих дозах.

Таблица 14.						
Копии CAR (в мкг ДНК)						
	День 1	День 7	День 14	День 21	День 28	День 35
Несущая среда	0,00E+00	3,88E-03	0,00E+00			
	7,91E-03	0,00E+00	0,00E+00			
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00			
	4,56E-03	1,85E-03	0,00E+00			
	6,94E-03	2,61E-03	0,00E+00			
NTD	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00			
	0,00E+00	5,36E-03	3,10E-03			
	4,22E-03	0,00E+00	0,00E+00			
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00			
	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00			
	7,27E-02	3,03E-01	1,13E-01	9,41E-02	8,81E-01	2,62E+00
		1,06E-01	4,53E-03	1,36E-01	9,35E-01	1,50E+00
Дзета (2E6)	1,20E-01	5,31E-01	5,82E-03	2,56E-02	2,70E-02	1,25E+00
	3,53E-01	1,44E-01	8,30E-03	1,91E-02	2,65E-02	1,79E-01
	3,36E-01	8,36E-01	6,26E-02	8,51E-03	3,00E-02	2,68E-01
	5,79E-01	5,09E-02	7,91E-03	8,67E-02	3,89E-01	4,29E-02
	1,25E-01	3,33E-01	1,80E-02	5,71E-02	2,06E-02	7,68E-01
Дзета (5E5)	2,22E-02	2,02E-01	5,50E-03	1,34E-02	2,67E+00	2,18E+00
	1,67E-01	1,66E-01	1,11E-01	5,04E-02	3,10E-01	6,50E-01
	1,64E-01	5,94E-02	0,00E+00	1,34E-01	1,51E-01	1,07E-01
	7,27E-02	3,03E-01	1,13E-01	9,41E-02	8,81E-01	2,62E+00
		1,06E-01	4,53E-03	1,36E-01	9,35E-01	1,50E+00
Dar12 (2E6)	2,52E-01	2,52E+00	2,33E-01	1,65E-01	2,35E-02	1,87E-01
	8,40E-02	2,31E+00	3,45E-01	5,22E-01	7,69E-01	1,73E+00
	1,48E-01	2,76E+00	1,45E-01	2,82E-01	1,99E-01	1,75E-01

Таблица 14.						
Копии CAR (в мкг ДНК)						
	День 1	День 7	День 14	День 21	День 28	День 35
	7,20E-02	1,04E+00	5,66E-01	1,81E+00	1,55E+00	2,09E+00
	2,52E-01	1,23E+00	2,76E-01	9,82E-03	9,13E-02	3,39E+00
Dap12 (5E5)	6,40E-02	4,32E-01	1,24E+00	3,98E-01	2,23E+00	2,08E+00
	4,36E-01	3,65E-01	1,08E-01	3,20E-01	1,39E+01	2,60E+00
	9,60E-02	1,32E-01	9,15E-02	4,36E-01	6,12E+00	5,05E+01
	1,92E-01	4,69E-01	1,36E+00	3,23E-01	7,11E+00	0,00E+00
	7,60E-02	6,14E-01	5,73E-01	3,79E+01	8,67E+00	7,62E+00
Эпсилон -CO (2E6)	3,76E-01	8,87E+00	2,57E+01	1,44E+02	6,06E+01	2,12E+02
	8,40E-02	2,46E+00	2,63E+00	1,53E+02	2,42E+02	1,40E+02
	3,08E-01	1,96E+00	3,01E+00	1,56E+02	1,34E+02	5,83E+01
	1,56E-01	3,59E+00	8,98E-01	8,78E+01	4,13E+02	2,44E+02
	2,12E-01	1,85E+00	5,95E+00	2,27E+02	4,65E+02	3,61E+02
Эпсилон -CO (5E5)	6,80E-02	1,72E-01	2,57E+00	2,20E+01	1,26E+02	4,90E+02
	2,84E-01	2,36E-01	4,77E-01	5,42E+01	1,42E+02	3,61E+02
	1,84E-01		1,71E+01	3,13E+02	1,22E+02	1,69E+02
	3,20E-01		1,73E+00	9,09E+01	5,20E+01	6,21E+01
	8,00E-02	2,32E-01	1,92E+00	1,29E+02	4,08E+01	8,49E+01
Дзета 1xx (2E6)	1,96E-01	9,51E+00	5,64E-01	9,47E+00	2,08E+01	5,62E+01
	1,24E-01	6,42E+00	8,06E-01	2,28E+00	6,61E+00	1,87E+01
	8,00E-02	5,61E+00	7,52E-01	1,95E+00	5,59E-01	1,35E+00
	1,60E-01	3,79E-01	2,17E-01	7,47E-01	1,46E+00	2,39E+00
	5,08E-01	4,49E+00	5,98E-01	1,50E-01	1,11E+00	4,21E-01
Дзета 1xx (5E5)	4,80E-02	1,08E+00	8,70E-01	4,41E+00	1,65E+01	6,01E+01
	1,48E-01	2,90E-01	1,13E+00	1,31E+01	3,47E+01	3,23E+01
	1,08E-01	2,01E-01	5,33E-03	1,18E+01	2,45E+00	2,74E+00
	3,32E-01	1,17E-01	1,44E+00	1,58E+01	3,59E+00	1,77E+00
	1,04E-01	1,58E-01	2,39E-01	4,21E+00	1,19E+01	6,39E+00

Пример 9

[0284] В следующем примере описаны три новых бицистронных конструкта CAR CD19/CD20 второго поколения, которые используют один из трех новых мутантных

доменов CD19_CD3 эпсилон-СО в качестве замены дзета-цепи CD3 дзета в эталонном контроле анти-CD19 CAR. Три мутанта CD3 эпсилон продемонстрировали улучшенную экспрессию CD19 CAR на мембране по сравнению с CD3 дикого типа эпсилон-СО, в бицистронных конструктах с CD20 CAR. Все были успешно трансдуцированы и экспрессированы в первичных человеческих Т-клетках. Эти новые конструкты CAR характеризовались с помощью анализов *in vitro*.

[0285] Разработка конструктов. Анти-CD19 CD3дзета химерный антигенный рецептор (CAR) второго поколения, далее именуется как CD19z, использовали для получения конструкта CD19 CD3 эпсилон-СО с последовательностью ATGGCACTTCCAGTCACCGCACTCTTGCTTCCACTGGCCTTGTTGCTGCATGCTGCG CGGCCAGATATACAGATGACCCAAACGACGTCTAGCCTCAGTGCGTCACTCGGGGATCGGGTGACAATTAGCTGCAGGGCTAGCCAGGATATTTCAAATATCTTAACTGGT ATCAACAAAAGCCAGATGGAACCGTAAACTGCTCATATACCACACCAGTCGCCTG CATTCAGGGGTTCCGAGCCGCTTTTCTGGGAGCGGTAGCGGAACtGAtTATAGCTTGA CAATAAGCAACCTCGAGCAGGAAGACATTGCGACGTACTTCTGTGTCAGCAAGGGAAC ACGCTGCCGTATACCTTCGGTGGCGGCACTAAACTGGAAATCACGGGATCTACGTC TGGATCCGGAAAACCTGGATCTGGTGAAGGATCCACTAAAGGCGAAGTCAAGTTGC AAGAGTCTGGACCTGGTCTCGTGGCACCTTCACAGTCACTCTCCGTTACCTGTACCG TATCTGGAGTTTCACTTCCCGACTATGGCGTGTGATGGATACGCCAACCACCGCGAA AAGGTCTTGAATGGCTGGGCGTTATCTGGGGATCCGAAACCACATACTACAACCTCT GCGCTCAAGTCACGGCTGACTATTATAAAGGACAATTCAAAGAGCCAAGTGTTCCCT GAAAATGAACAGCCTGCAGACTGATGACACTGCAATATATTA CTGCGCCAAGCATT ACTATTACGGCGGATCTTACGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCTGTAACA GTCAGCTCCGCGGCCGCATTGGACAATGAAAAATCCAATGGCACAATAATTCATGT AAAGGGCAAACACTTGTGTCCTAGCCCACTCTTTCCTGGTCCGTCTAAACCGTTTTG GGTGCTCGTTGTGGTTGGAGGCGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGTTGGTGA CTGTAGC STTTATAATATTCTGGGTTAGAAGCAAACGAAGTAGGCTTTTACATTCACTATAT GAACATGACACCAAGACGCCCCGGCCCCACAAGAAAACACTATCAGCCSTATGCTC CGCCTCGGGACTTCGCTGCTTACCGAAGCAAGAACC GCAAAGCAAAGGCAAACCC GTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCC CGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTC TACTCCGGTCTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO: 90), которую, в свою очередь, использовали в качестве исходной матрицы для конструирования трех дочерних конструктов, содержащих мутации в сигнальном домене эпсилон-СО, называемых эпсилон-СО (Δ181–185), эпсилон-СО (R183K) и эпсилон-СО (S178N.R183K). Для

получения «дочерних» конструкторов из исходного сигнального белка CD3 дзета, нуклеиновые кислоты 3316–3651 исходной матрицы заменяли следующими последовательностями:

Эпсилон-СО:

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
ССААТТСГГААГГГАСААСГСГАТСТТАСТССГГТСТСААТСАГААГГСГААТТ
(SEQ ID NO: 54)

Эпсилон-СО (Δ181–185):

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
ССААТТСГГААГГГАСААСГСГАТСТТАСТССГГТСТС (SEQ ID NO: 79)

Эпсилон-СО (R183K):

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
ССААТТСГГААГГГАСААСГСГАТСТТАСТССГГТСТСААТСАГААГСГААТТ
(SEQ ID NO: 80)

Эпсилон-СО (S178N.R183K)

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
ССААТТСГГААГГГАСААСГСГАТСТТАСААСГГТСТСААТСАГААГСГААТТ
(SEQ ID NO: 81)

Затем конструктор CAR CD19 дзета и конструкторы, содержащие CD3 эпсилон-СО и мутации в сигнальном домене CD3 эпсилон, собирали в бицистронном формате путем включения расщепляемой фурином области Т2А с CD3-дзета CD20 (CD20z) второго поколения для получения совместной экспрессии двух отдельных CAR, далее называемых CD19z/CD20z, сD19 эпсилон (Δ181–185)/CD20z, сD19 эпсилон (R183K)/CD20z и CD19 эпсилон (S178N.R183K)/CD20z, как показано на Фиг. 1.

[0286] Получение продуктов CAR Т-клеток. Материал, полученный с помощью афереза от здорового донора-человека, промывали, инкубировали с магнитными гранулами, связанными с антителом к CD8, и обрабатывали с использованием системы разделения клеток CliniMACS® (Miltenyi Biotech) согласно инструкциям производителя для

обогащения CD8⁺ Т-клеток, которые затем криоконсервировали. Полученную отрицательную фракцию промывали и обрабатывали, как описано выше, с использованием магнитных гранул, связанных с антителом к CD4, для обогащения CD4⁺ Т-клетками, которые затем криоконсервировали. Выделенные CD4⁺ и CD8⁺ первичные человеческие Т-клетки размораживали в базальной среде OpTmizer CTST[™] для экспансии Т-клеток с добавлением 2,6% добавки для экспансии Т-клеток OpTmizer CTST[™], 2,5% заменителя иммунных клеток CTS, 1% пенициллин/стрептомицина/L-глутамин и 305 международных единиц/мл человеческого интерлейкина (IL)-2, далее именуется полной средой OpTmizer[™]. Т-клетки ресуспендировали в полной среде OpTmizer[™], содержащей 1,66 мкг/мл антитела к CD28 (клон 28.2) при плотности 1,5 x 10⁶ клеток/мл и затем высевали в пакеты PL07, предварительно покрытые 1,23 мкг/мл антитела к CD3 (клон ОКТ3), чтобы индуцировать активацию Т-клеток (день 0). В день 1 после активации клетки либо трансдуцировали LVV, кодирующим исходный бицистронный CD19z/CD20z CAR и конструкт, содержащий CD19-эпсилон-СО/CD20z CAR при MOI 10. Нетрансдуцированный (NTD) образец служил отрицательным контролем. Т-клетки промывали полной средой OpTmizer[™] на день 3, нормализовали и размножали в течение дополнительных 9 дней (дни 3–9). В момент сбора клеток (день 9) клетки криоконсервировали для будущей оценки экспрессии. В несколько моментов времени во время экспансии (дни 3–9) количество клеток отбирали с использованием Vi-CELL, а плотность клеток нормализовали до 0,5 x 10⁶ клеток/мл путем добавления полной среды OpTmizer[™]. В этих временных точках среднее значение жизнеспособности клеток, диаметр и плотность клеток регистрировали на Vi-CELL.

[0287] Определение экспрессии CD3 эпсилон-СО/CD20z CAR. Полученные D9 CD19z/CD20z, CD19-эпсилон-СО/CD20z и NTD клетки размораживали и хранили в течение ночи в среде OpTmizer[™] для оценки экспрессии CAR. Экспрессию оценивали с использованием рекомбинантного пептида huCD19-His и антиидиотипического антитела (24C12) для оценки индивидуальной экспрессии CD19 и CD20 CAR соответственно. Оценивали параллельную мембрану и внутриклеточную экспрессию для каждого CAR.

[0288] Получение продуктов CAR Т-клеток. Материал, полученный с помощью афереза от здорового донора-человека, промывали, инкубировали с магнитными гранулами, связанными с антителом к CD8, и обрабатывали с использованием системы разделения клеток CliniMACS® (Miltenyi Biotech) согласно инструкциям производителя для обогащения CD8⁺ Т-клеток, которые затем криоконсервировали. Полученную отрицательную фракцию промывали и обрабатывали, как описано выше, с использованием магнитных гранул, связанных с антителом к CD4, для обогащения CD4⁺ Т-клетками,

которые затем криоконсервировали. Выделенные CD4⁺ и CD8⁺ первичные человеческие Т-клетки размораживали в базальной среде OpTmizer CTST[™] для экспансии Т-клеток с добавлением 2,6% добавки для экспансии Т-клеток OpTmizer CTST[™], 2,5% заменителя иммунных клеток CTS, 1% пенициллин/стрептомицин/L-глутамин и 305 международных единиц/мл человеческого интерлейкина (IL)-2, далее именуется полной средой OpTmizer[™]. Т-клетки ресуспендировали в полной среде OpTmizer[™], содержащей 1,66 мкг/мл антитела к CD28 (клон 28.2) при плотности 1,5 x 10⁶ клеток/мл и затем высевали в пакеты PL07, предварительно покрытые 1,23 мкг/мл антитела к CD3 (клон ОКТ3), чтобы индуцировать активацию Т-клеток (день 0). В день 1 после активации клетки трансдуцировали LVV, кодирующим родительский бицистронный CD19z/CD20z CAR или использовали конструкции, содержащие CD19-эпсилон-СО (Δ 181–185)/CD20z, CD19-эпсилон-СО (R183K)/CD20z или CD19-эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z при MOI 10. Нетрансдуцированный (NTD) образец служил отрицательным контролем. Т-клетки промывали полной средой OpTmizer[™] на день 3, нормализовали и размножали в течение дополнительных 6 дней (дни 3–9). В момент сбора клеток (день 9) клетки криоконсервировали для будущего применения. В несколько моментов времени во время экспансии (дни 3–9) количество клеток отбирали с использованием Vi-CELL, а плотность клеток нормализовали до 0,5 x 10⁶ клеток/мл путем добавления полной среды OpTmizer[™]. В этих временных точках среднее значение жизнеспособности клеток, диаметр и плотность клеток регистрировали на Vi-CELL.

[0289] Экспрессию CAR измеряли с помощью проточной цитометрии в дни 7 и 9. Т-клетки окрашивали панелью антител, конъюгированных с флуорофором и подвергали анализу с помощью проточной цитометрии для определения эффективности трансдукции и соотношений CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток. Оценка экспрессии каждого плеча CAR обеспечивалась с помощью антитела FMC63, конъюгированного с флуорофором (идиотип для анти-CD19 CAR, также известного как CDL) и 24C12 (идиотип для анти-CD20 CAR). Общую эффективность трансдукции CAR оценивали с использованием KIP-1, специально изготовленного антитела, которое связывает линкер Whitlow между тяжелой и легкой цепями одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) CD19 и CD20 CAR. Для обеспечения специфического анализа жизнеспособных клеток использовали фиксируемый краситель жизнеспособность клеток. Клетки окрашивали путем инкубации с соответствующей смесью антитела в течение 30 минут при 4 °С с последующими 2 промывками буфером для окрашивания, а затем фиксировали путем инкубации в параформальдегиде в фосфатно-солевом буферном растворе в течение 10 минут при

комнатной температуре. Все данные проточной цитометрии собирали на приборе Attune NxT и анализировали данные с использованием программного обеспечения FlowJo.

[0290] Подготовка совместного культивирования в день 0. Т-клеточные продукты, полученные из Т-клеток, полученных путем афереза от здорового донора, криоконсервировали в день сбора (день 9 получения). Затем Т-клеточные продукты размораживали и хранили в течение ночи в полной среде R-10% [среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина-стрептомицина, L-глутамина и NEPES] до начала совместного культивирования с клетками-мишенями. Непосредственно перед началом совместного культивирования аликвоту каждого образца Т-клеток инкубировали с панелью антител-флуорофоров и анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки эффективности трансдукции. Оценка экспрессии каждого плеча CAR обеспечивалась с помощью антитела FMC63, конъюгированного с флуорофором (идиотип для анти-CD19 CAR, также известного как CDL) и 24C12 (идиотип для анти-CD20 CAR). Общую эффективность трансдукции CAR оценивали с использованием KIP-1, специально изготовленного антитела, которое связывает линкер Whitlow между тяжелой и легкой цепями одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) CD19 и CD20 CAR. Затем Т-клетки маркировали реагентом CellTrace™ Violet (CTV) и затем промывали средой R-10%. Часть CTV-меченных образцов фиксировали и хранили при 4 °C до дня 4, когда образцы анализировали параллельно с образцами совместного культивирования дня 4 с помощью проточной цитометрии для оценки начальных уровней сигнала CTV (CTV Max). Т-клеточные продукты и клетки-мишени, экспрессирующие люциферазу, высевали вместе при различных соотношениях эффектора к мишени (E : T) в диапазоне от 3 : 1 до 1 : 243 в среде R-10% (день 0 совместного культивирования). Т-клеточные продукты последовательно разводили в 3 раза, а количество клеток-мишеней на лунку поддерживали постоянным на уровне 25 000 клеток. Положительные клетки-мишени включали Raji (CD19+/CD20+) Nalm6 MHC I/II KO (CD19+.CD20+) и ST486 (CD19+/CD20+), в то время как Raji CD19 KO (CD19-/CD20+), Raji CD20 KO (CD19+/CD20-) и K-562 (CD19-/CD20-) служили антигенотрицательными контрольными пробами. Т-клеточные продукты культивировали в отсутствие каких-либо клеток-мишеней (т. е. только Т-клеток) для оценки базальных уровней Т-клеточной функции в отсутствие стимуляции антигена. Сокультуры инкубировали при 37 °C в течение 1 или 4 дней, а функциональные оценки проводили, как описано ниже.

[0291] Цитотоксичность на день 1 и день 4. Т-клеточноопосредованную цитотоксичность измеряли как функцию снижения целевого сигнала люциферазы в лунках совместного культивирования по сравнению с сигналом, испускаемым только клетками-мишенями. На

дни 1 и 4 после начала совместного культивирования в лунки совместного культивирования добавляли субстрат D-люциферин в конечной концентрации 0,14 мг/мл, и планшеты инкубировали при 37 °С в темноте в течение 10 минут. Затем сразу считывали люминесцентный сигнал на мультимодальном микропланшетном фотометре PerkinElmer EnVision®. Т-клеточноопосредованную цитотоксичность рассчитывали следующим образом: % цитотоксичности = $[1 - \text{сигнал люциферазы (интересующего образца / только контроля мишени)}] * 100$.

[0292] Получение цитокинов на день 1. На день 1 после начала совместного культивирования супернатанты собирали и анализировали на уровни цитокинов с использованием набора для провоспалительной панели 1 (человек) Meso Scale Discovery V-PLEX в соответствии с инструкциями производителя. В частности, супернатанты из совместных культур Т-клеточных продуктов, которые высевали на планшет при соотношении Е : Т 1 : 1 с антигенэкспрессирующим Raji (CD19+CD20+), Raji CD19 Knockout (KO) (CD19-CD20+), Raji CD20 Knockout (KO) (CD19+CD20-), Nalm6 МНС I/II Knockout (KO) (CD19+CD20minimal), ST486 (CD19+CD20+) и К-562 (CD19-CD20-), анализировали на уровни интерферона гамма (IFN- γ), IL-2 и секреции фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), опосредованной антигеном. Супернатанты из антигенотрицательных совместных культур (К-562) анализировали параллельно для оценки базальных уровней продукции цитокинов в отсутствие антигена. Все образцы разводили так, чтобы они оставались в пределах диапазона обнаружения.

[0293] Пролиферация на день 4. На день 4 после начала совместного культивирования собирали Т-клеточные продукты, которые были посеяны на пластине при соотношении Е : Т 3 : 1, с клетками-мишенями, окрашивали с помощью панели антител-флуорофоров для идентификации Т-клеток и анализировали с помощью проточной цитометрии. Пролиферативную способность Т-клеточных продуктов определяли с помощью проточной цитометрии обусловленного делением клеток разведения красителя CTV в ответ на антигенэкспрессирующие клетки-мишени по сравнению с клетками-мишенями Т-клеточных продуктов, которые были культивированы отдельно (только Т-клетки), которые использовали для оценки базальных уровней гомеостатической пролиферации в отсутствие стимулов. CTV-меченные Т-клетки, которые фиксировали в день подготовки совместного культивирования (CTV Max), анализировали с помощью проточной цитометрии параллельно для оценки интенсивности исходного сигнала CTV до пролиферации клеток.

[0294] Получение CAR T-клеток продукта. Количество клеток, жизнеспособность клеток и диаметр клеток отслеживали с дня 0 по день 9 для каждой из различных экспериментальных групп и обобщали в таблице 15.

Таблица 15. Данные девятидневной экспансии трансдуцированных конструкторов																
Экспериментальные группы	Количество клеток (10^6)						Жизнеспособность (%)					Диаметр (мкм)				
	День 1	День 3	День 6	День 8	День 9	День 0	День 3	День 6	День 8	День 9	День 0	День 1	День 3	День 6	День 8	День 9
NTD	8,4	6,65	55,9	90,5	110,4	92,4	85,7	87,8	92,1	92,8	7,91	8,73	10,9	10,0	9,38	9,29
CD19z/CD20z	8,4	10,1	85,3	148	235	92,4	81,0	85,0	93,4	94,8	7,91	8,73	11,2	10,0	9,54	9,49
CD19 эпсилон-CO/CD20z	8,4	6,0	50,4	104	118	92,4	83,4	82,8	89,4	96,7	7,91	8,73	11,2	10,5	9,82	9,93

[0295] Эффективность трансдукции CAR T-клеток продукта на день 9. Экспрессию CAR измеряли на размороженных и восстановленных в течение ночи на день 9 клеток посредством мембранных и внутриклеточных состояний окрашивания с использованием рекомбинантного пептида huCD19-His и идиотипа анти-CD20 CAR (24C12) для обнаружения каждого CAR по отдельности. Экспрессия CAR CD19 в конструкторе CD19 эпсилон-CO/CD20z увеличилась с 14% до 53,5% в условиях мембранной проницаемости. Экспрессия CD20 CAR в любом состоянии окрашивания или конструкторе оставалась сходной с увеличением на около 11–12% в условиях мембранной проницаемости. Проценты трансдукции обобщены в таблице 16.

Таблица 16. Данные экспрессии трансдуцированных конструкторов				
Экспериментальные группы	% трансдукции (huCD19-His+) CD19 CAR		% трансдукции (24C12+) CD20 CAR	
	Мембранный	Внутриклеточный	Мембранный	Внутриклеточный
NTD	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
CD19z/CD20z	49,23	44,9	40,1	52,6
CD19 эпсилон-CO/CD20z	14,4	53,5	63,4	74

[0296] Получение CAR T-клеток продукта. Количество клеток, жизнеспособность клеток и диаметр клеток отслеживали с дня 0 по день 9 для каждой из различных экспериментальных групп и обобщали в таблице 17.

Экспериментальные группы	Количество клеток (10 ⁶)				Жизнеспособность (%)				Диаметр (мкм)			
	День 1	День 3	День 6	День 9	День 0	День 3	День 6	День 9	День 0	День 3	День 6	День 9
NTD	3,9	4,5	21	147	92,2	77,0	90,8	94,6	8,9	10,5	9,6	10,0
CD19z/CD20z	3,9	5,6	32	159	92,2	70,1	89,3	95,3	8,9	10,9	9,9	10,0
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	3,9	4,8	26	98	92,2	71,8	84,1	88,3	8,9	10,8	10,6	10,5
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	3,9	2,4	16	68	92,2	69,3	77,7	90,3	8,9	10,8	10,6	10,5
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	3,9	4,6	24	119	92,2	74,2	84,4	93,6	8,9	10,6	10,4	10,3

[0297] Эффективность трансдукции CAR Т-клеток продукта. Экспрессию CAR измеряли на день 7 и/или на день 9 получения с помощью окрашивания KIP-1 (общая), CDL (CD19 CAR) и 24C12 (CD20 CAR) и последующего анализа методом проточной цитометрии (таблица 18). Экспериментальные группы показали сопоставимую общую и индивидуальную экспрессию CAR на день 7 в диапазоне от 85% до 98% для мутантных экспрессирующих конструктов CD3 эпсилон-СО конструктов и от 42 до 49% для CD19z/CD20z. Экспрессия CAR оставалась относительно стабильной на день 9 для всех конструктов.

Экспериментальные группы	% трансдукции (Kip1+) общий CAR				% трансдукции (CDL+) CD19 CAR				% трансдукции (24C12+) CD20 CAR			
	День 0	День 3	День 7	День 9	День 0	День 3	День 7	День 9	День 0	День 3	День 7	День 9
	NTD	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
CD19z/CD20z	Н/П	Н/П	Н/П	42,2	Н/П	Н/П	44,1	39,0	Н/П	Н/П	47,6	49,0
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	Н/П	Н/П	Н/П	90,2	Н/П	Н/П	91,7	85,8	Н/П	Н/П	97,6	94,9
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	Н/П	Н/П	Н/П	91,1	Н/П	Н/П	92,3	86,3	Н/П	Н/П	98,5	97,4
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	Н/П	Н/П	Н/П	86,3	Н/П	Н/П	88,8	79,5	Н/П	Н/П	97,6	95,9

[0298] Эффективность трансдукции CAR T-клеток продукта на день 0 совместного культивирования. После того, как образцы оттаивали и их оставляли на ночь, образец каждой экспериментальной группы окрашивали для оценки их процентного выхода и экспрессии CAR. Затем группы нормализовали до самого низкого процента трансдукции на экспрессию 24C12 (31%) путем добавления NTD-клеток. Это делали для обеспечения того, чтобы все образцы имели одинаковое количество CAR+ в последующих анализах. Клетки продуктов нормализовали и поддерживали в диапазоне от 22% до 32% посредством экспрессии CAR CD20 (таблица 19).

Таблица 19. Подготовка экспрессии CAR T-клеток продукта на день 0 совместного культивирования						
Экспериментальные группы	% трансдукции (Kip1+) общий CAR		% трансдукции (CDL+) CD19 CAR		% трансдукции (24C12+) CD20 CAR	
	Пре-нормализация / выдерживание в течение ночи	Пост-нормализация	Пре-нормализация / выдерживание в течение ночи	Пост-нормализация	Пре-нормализация / выдерживание в течение ночи	Пост-нормализация
NTD	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
CD19z/CD20z	34,5	32,8	34,6	30,4	33,8	32,0
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	80,6	22,2	76,7	19,5	83,8	24,5
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	81,4	19,4	75,2	15,7	85,6	22,4
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	72,7	24,3	67,4	20,0	76,3	27,3

[0299] Цитотоксичность. Данные, полученные в день 1 (таблица 20) и в день 4 (таблица 21), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией Raji без существенных различий между конструктами.

Таблица 20. Данные определения функциональных характеристик на день 1: процент цитотоксичности клеточной линии Raji при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение E : T						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243

NTD	-1,8	-2,2	-6,4	-0,7	-5,9	-0,8	5,1
	-2	-3,2	0,9	-2,8	-9,3	-0,6	-1,5
	-3,8	-8,2	-6,3	-5,8	-14,8	-4,9	-7,1
CD19z/CD20z	26,1	11,2	1,8	-0,5	-7,1	-7,5	-5,2
	24,8	6,6	4,1	1,3	-6,6	-6,7	0,3
	21,2	2,4	0,5	-3	-10,4	-9,1	-7,6
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	22,4	4,8	0,2	2,8	-8,3	-3	-2,4
	26,4	4,7	2,5	-1,5	-9,9	-0,5	-4,4
	20,8	7,8	-5,5	-2,4	-14,3	-11	-10
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	26,2	10,5	5,8	-1,3	-4,9	-7,4	-10,3
	22,4	7,3	1,1	1,8	-3,9	-5,3	-1,8
	18,8	3,1	2,3	-7,7	-12	-12,9	-11,4
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	30	10,7	4,9	0,4	-7,8	-5	-4,4
	23	11,1	3,3	2,1	-7,1	-0,1	-2
	24,7	3,2	-0,4	-5,2	-9,3	-4,8	-4,3

Таблица 21.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4: процент цитотоксичности клеточной линии Raji при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	38,8	14,1	4,1	-1,3	-7,8	-11	-4,5
	46,3	16,4	6,4	-5,8	-10,9	-8,6	-7,9
	36,8	15,4	3,6	-10,2	-9,4	-12,8	-7
CD19z/CD20z	83,7	35,6	20	5,3	-1,7	-7,8	-4,8
	85,2	29,8	17,1	-1,1	-10,8	-9,6	-2
	90,9	30,8	13,9	3	-11,1	-10,9	-10,8
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	81,8	41,1	23,5	-0,8	-7,3	-11	-7,9
	84,3	39,7	16,3	-0,4	-13,1	-10	-8
	84,9	37,3	22,1	-0,4	-9,4	-6,4	-9,3
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	76,8	40,1	19,5	1,8	-8,4	-10,3	-7,3
	75,8	32,8	18,8	1,6	-12,9	-10,1	-6,6
	82	40,6	19,4	3,7	-16,4	-13,7	-6,4
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	82	38,6	22,6	10,7	-7,3	-8	-6,9
	84,1	35,3	19	0,1	-12,2	-8,6	-5,5
	87,5	38,5	20,1	-0,1	-8,5	-6,3	-1,6

[0300] Данные, полученные в день 1 (таблица 22) и в день 4 (таблица 23), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией Raji CD19 KO без существенных различий между конструктами.

Таблица 22.

Данные определения функциональных характеристик на день 1: процент цитотоксичности клеточной линии Raji CD19 KO при трехкратном повторении							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	-6,3	-10,3	-7,2	-7,6	-12,1	-8,9	-9,4
	4,3	1,2	-1,3	-0,7	-6,9	-5,1	-3
	-0,2	-5,2	-2,4	-4,3	-9,5	-5,3	-3
CD19z/CD20z	22,1	6,4	0	-4,4	-9,4	-9,5	-9
	26,7	9,5	4,3	-1,1	-8,9	-6,5	-7,6
	24,9	6,5	1,4	-4,8	-11,8	-10,1	-5,6
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	23,4	5,2	-3,1	-7,3	-16,2	-11,8	-6
	27,9	8,6	1	-4,7	-10,1	-9,3	-4,2
	23,7	7,8	1,6	-12,9	-20,1	-10,5	-6
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	22,8	6,6	-3,5	-5,4	-12,4	-7,9	-6,4
	27,4	6,9	2	-7,3	-15,8	-8,6	-8,9
	22,9	7,1	-1	-6,7	-15,8	-12,8	-6,9
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	27,3	9	1,4	-3,8	-12	-10,2	-9,5
	30,1	12,5	1,6	-3,3	-13,8	-9,5	-5,2
	27,3	9,4	0,2	-4,2	-18,7	-10,1	-8,3

Таблица 23.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4: процент цитотоксичности клеточной линии Raji CD19 KO при трехкратном повторении							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	34	12	-0,3	-5,5	-9,5	-9,6	-5,9
	36	11,5	0,2	-5,3	-10,8	-8,7	Н/П
	34,2	12,4	0,8	-3,5	-10,6	-7,3	-6,2
CD19z/CD20z	79,9	42,9	17,3	-3,9	-8,2	-12,8	-7,3
	81,7	44,2	16,5	-2,1	-9,1	-11,1	-8,1
	80,7	44,6	17,4	-0,9	-11,9	-12,1	-10,3
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	80,7	47,6	21,1	-1,4	-10,9	-12,3	-7
	79	47,7	19,7	2,3	-12,7	-13,9	-5,5
	82,2	47,6	18,4	-1,3	-12,1	-14,1	-7,1
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	78,9	42,3	17,8	-2,4	-14,7	-12,2	-5,7
	77,9	42,9	16,6	-0,8	-11,6	-12,4	-8,1
	79,3	44,9	15,7	-2,9	-15,4	-9,5	Н/П
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	85,2	52	20,3	0,5	-13,8	-13,1	-9,2
	84,4	50,2	21,2	-0,2	-11,6	-12,2	-8,6
	85	49,2	18,7	-1,2	-12,2	-9,1	-8,1

[0301] Данные, полученные в день 1 (таблица 24) и в день 4 (таблица 25), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией Raji CD20 KO без существенных различий между конструктами.

Таблица 24.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1: процент цитотоксичности клеточной линии Raji CD20KO при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	4,2	-6,8	-5	-0,7	-5	-4,2	-4,8
	9,9	-1,3	-3,7	-1,6	-5,2	-4,5	4,3
	6,3	-3,3	0,4	-2,8	-5,6	-3,1	-1,7
CD19z/CD20z	64,7	34,4	13,1	2,2	-5,7	-8	-2,4
	66,5	35,9	20,7	6,3	-3,1	-2,3	0,1
	64,4	32,7	16	3,8	-7,6	-3,1	-1,6
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	61,1	28,6	8,9	-1,3	-9,2	-3,3	0,7
	60,5	28,9	11	3,6	-3,5	-1,8	2,9
	57,9	31,3	14,4	-4,5	-17,8	-5,2	-1
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	59,7	31,4	14,3	1,9	-8,4	-9,2	-3,1
	61	31,2	14,3	3,4	-5,9	-1,9	1,9
	58,8	29,4	8,7	-1,9	-8,3	-9,5	-4,9
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	58,1	30,5	14,2	3,5	-7,8	-7,1	-1,3
	59,4	33,7	11,5	7,7	-7	-1,7	-4,6
	55,6	33,6	7,4	-0,8	-7,3	-6,3	-5,8

Таблица 25.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4: процент цитотоксичности клеточной линии Raji CD20 KO при трехкратном повторении							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	47,2	14,5	-2,5	-11,5	-15,9	-11,1	-5,3
	48	10,8	0,9	-7,5	-9,3	-6,1	-3,1
	45,1	12,3	-2,4	-9,2	-9,3	-12	5,2
CD19z/CD20z	98,8	89,6	51,9	16,8	-5,9	-4,3	-4,4
	99,5	90	58,1	26,4	0,1	3,9	-2,9
	99,4	92,3	67,4	18,9	-7,5	-4,7	6,4
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	94,9	82,2	46,7	14,9	-3,4	-8	0,3
	95,3	83,2	49	20,8	3	0,5	0,5
	95,4	89,9	63,3	21,7	-2,8	-5,3	-3,4
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	94,6	80	42,9	7,3	-1	-1,8	1,9
	95,5	83,1	44,1	13,5	-0,9	-3,1	4,9
	96,4	88,4	63	25,1	5,2	-11,8	-8,6
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	92,3	81,8	49,6	14,5	-6,9	-0,8	5
	91,8	81,4	49,3	20,5	0,2	-1,9	5,5
	93,9	88,9	68,7	14,2	-2,3	-11,7	10,1

[0302] Данные, полученные в день 1 (таблица 26) и в день 4 (таблица 27), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией Nalm6 МНС I/II КО без существенных различий между конструктами.

Таблица 26.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 МНС I/II КО при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	-1,2	-5,2	-8	-6,1	-11,1	-8,3	-9,5
	4,5	-1,7	-0,4	-4,8	-8,3	-6	-4,4
	3	-2	-1,9	-2,2	-6	-6,1	-4
CD19z/CD20z	97,3	82,4	45,3	16,6	-0,8	-4,4	-4,6
	97,9	81,2	43,6	13,9	-2,9	-5,6	-1,4
	96,2	79,7	43,8	18,8	-2,4	-5,9	-4,6
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	94,2	63,1	30,4	8,7	-7,3	-7,8	-7,2
	93,9	65,6	29,1	5,6	-7,5	-11,4	-6,9
	91,9	61,9	28,5	4,7	-8,2	-5,2	-3,7
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	93,2	61,4	24,7	4,4	-7,7	-8,9	-6,2
	93,1	61,2	24,9	5,1	-10,6	-7	-8
	92,4	63	27,6	1,9	-9,5	-9,1	-5,3
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	95,4	66,7	29,6	8,2	-7	-8,7	-6,9
	94,7	67,9	30	8,9	-9,7	-5,7	-6
	94,8	66,7	31,4	4,2	-6	-6,4	-6,7

Таблица 27.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 МНС I/II КО при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	6	-3,3	Н/П	-15	0	-18,5	Н/П
	4,8	-5,3	Н/П	-16,1	-4,6	-15	Н/П
	4,8	-2,3	Н/П	-15,4	0,9	-19,4	Н/П
CD19z/CD20z	100	100	98,4	83,9	47,9	13,8	Н/П
	100	100	98,6	84,6	52,3	14,9	Н/П
	100	100	98,8	87,9	52,1	20,6	Н/П
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	100	99,3	80,5	20,5	-6,3	-19,1	Н/П
	100	99,6	77	20,7	-12	-20,1	Н/П
	100	99,8	81,8	16	-3,2	-20,6	Н/П
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	100	99,3	75,4	12	-10,6	-16	Н/П
	100	98,9	75,8	10,4	-11,5	-17	Н/П
	100	99,8	80,5	9,8	-9,6	-18,7	Н/П

Таблица 27.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 МНС I/II КО при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	100	100	86,1	24	-4,6	-17,5	Н/П
	100	99,9	82,8	22,9	-6,2	-17,1	Н/П
	100	100	90,8	24,8	-10,2	-18,7	Н/П

[0303] Данные, полученные в день 1 (таблица 26) и в день 4 (таблица 27), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией ST486 без существенных различий между конструктами.

Таблица 26.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1: процент цитотоксичности клеточной линии ST486 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	3,6	-5,7	-7,9	-10,3	-12,8	-10,3	7,3
	10,3	0,4	-1,2	-3,2	-7,2	-4,8	-4,7
	0,4	-3,1	-1,5	-0,6	-3,1	-2,7	0,4
CD19z/CD20z	98,3	86,2	45,6	15,4	-7,7	-9,2	-8,2
	98,2	86,3	53,7	18,9	0,8	-5	-4,4
	97,3	85,2	51	21,7	3,4	-1,4	0,1
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	98,1	87,2	51,6	12,6	-7,4	-9,7	-7,7
	98,5	87,5	53,2	18,1	-7,8	-7,5	-4,2
	98	87,8	49,2	16,7	-0,8	0,5	-1,9
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	98,1	86,6	48	11,1	-8,4	-7,8	-5,3
	98,1	86,2	50,3	15,5	-8,1	-5,7	-8
	97,5	83,8	46,8	17,4	-1,4	-3,7	-1,7
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	98,5	89,2	55,4	15,6	-4,3	-8,2	-7,6
	98,8	90	55,3	19,8	-4,7	-4,4	-4,7
	98,4	89,7	54,7	21,5	-0,6	2,5	-2,5

Таблица 27.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4: процент цитотоксичности клеточной линии ST486 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	59,2	8,5	-8,1	-12,5	0,3	-12,3	30,4
	44,5	4,5	-6,2	-9,5	1,8	-9,7	25,5
	46,5	-3,7	-13,4	-17,9	9,6	-23,9	16,2

CD19z/CD20z	100	99,9	99,2	88,1	53	24,4	22,9
	99,9	100	98,1	83,6	49,6	20,7	17,8
	99,9	99,9	99,6	84,3	46,2	7,8	10,7
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	99,9	100	98,5	80,5	39	0,9	8,4
	99,9	99,9	99,6	82,5	34,9	7,4	14,7
	99,8	99,9	99,8	80,4	27,6	1,1	1,9
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	100	100	98	76,9	29,4	2,3	8,9
	99,9	99,9	98,4	77,2	35,5	4,6	17
	99,8	99,9	99,3	71,1	27,6	-0,4	1,1
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	99,9	100	99,4	86,3	45	13	4,6
	99,9	99,9	99,2	85,5	50,3	8,4	14,2
	99,8	99,9	99,9	89,4	39,5	3,9	22,3

[0304] Данные, полученные в день 1 (таблица 28) и в день 4 (таблица 29), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией К-562 без существенных различий между конструктами.

Таблица 28.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1: процент цитотоксичности клеточной линии К-562 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	-3,9	-9,2	-6,8	-4,5	-8,2	-11,4	-5,7
	5,1	-8,3	1,5	-0,3	0	0,3	0,8
	-1,2	-4,8	-1	-2,3	-6,8	-6,8	-1,6
CD19z/CD20z	-8,1	-6,9	-3,7	-3,5	-12,2	-9,7	-3,7
	-3,4	-7,7	2,5	-3,3	-7	-2,4	2,2
	-1,8	-8,3	-4,9	-4,3	-8,5	-2,3	-2,6
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	-0,1	-8,2	-2,1	-10,8	-15,2	-9,5	-2,1
	3,5	-10,5	-5,6	-7,8	-14,1	-12,3	-2,6
	6,5	-7,7	-8,9	-12,9	-18,9	-10,2	1,2
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	4,8	-4,9	-1	-11,6	-13,4	-9,2	-3
	5,4	-4,7	-1	-4,2	-15,3	-7,6	2,2
	7,5	-6,6	-11,2	-7,2	-15,9	-11,2	2,6
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	-1,9	-8,3	-5,5	-10,3	-13	-8,5	-4
	5,3	-6,1	-2	-8,8	-10,6	-9,8	2,4
	6,6	-3,5	-5,9	-13,2	-18,2	-5,9	2,1

Таблица 29.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4: процент цитотоксичности клеточной линии К-562 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243

NTD	6,3	-9,7	-14,1	-24,7	-25,6	-25,6	17,5
	2,2	-0,1	-17,4	-19,4	-20,4	-21,4	Н/П
	6,4	-3,8	-14,5	-15,6	-23,2	-18,8	-9,5
CD19z/CD20z	-8,1	-6,9	-3,7	-3,5	-12,2	-9,7	-3,7
	-3,4	-7,7	2,5	-3,3	-7	-2,4	2,2
	-1,8	-8,3	-4,9	-4,3	-8,5	-2,3	-2,6
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	-0,1	-8,2	-2,1	-10,8	-15,2	-9,5	-2,1
	3,5	-10,5	-5,6	-7,8	-14,1	-12,3	-2,6
	6,5	-7,7	-8,9	-12,9	-18,9	-10,2	1,2
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	4,8	-4,9	-1	-11,6	-13,4	-9,2	-3
	5,4	-4,7	-1	-4,2	-15,3	-7,6	2,2
	7,5	-6,6	-11,2	-7,2	-15,9	-11,2	2,6
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	-1,9	-8,3	-5,5	-10,3	-13	-8,5	-4
	5,3	-6,1	-2	-8,8	-10,6	-9,8	2,4
	6,6	-3,5	-5,9	-13,2	-18,2	-5,9	2,1

[0305] Получение цитокинов на день 1. Супернатант собирали из соотношения E : T 1 : 1 и анализировали с помощью MSD на секрецию IFN- γ , IL-2 и TNF- α . Анализ показал, что все конструкторы (таблицы 30 и 31) секретировали цитокины при совместном культивировании с антигенэкспрессирующими клеточными линиями Raji, Raji CD19 KO, Raji CD20 KO, Nalm6 MHC I/II KO и ST486. Все мутантные конструкторы CD3 эпсилон-СО секретировали аналогичные уровни цитокинов во всех клеточных линиях. Совместное культивирование с клеточными линиями Raji и Nalm6 вызывало более высокие уровни цитокинов по сравнению с уровнями, секретлируемыми клеточной линией ST486, однако общая иерархическая картина конструкторов была постоянной во всех клеточных линиях. С другой стороны, контрольная группа NTD не секретировала какие-либо измеряемые или значительные уровни цитокина при культивировании отдельно или с антигенэкспрессирующими клеточными линиями. Результаты измерения цитокинов INF γ < 1,76 пг/мл, IL-2 < 0,890 пг/мл и TNF α < 0,690 пг/мл ниже предела количественного определения анализа (<LOQ).

Экспериментальные группы	Цитокины	Raji		Raji CD19 KO		Raji CD20 KO	
		Средн. пг/мл	% CV	Средн. пг/мл	% CV	Средн. пг/мл	% CV
NTD	IFN- γ	152	10	113,7	14	136,3	3
	IL-2	180,3	17	17,2	18	17,16	27

	TNF- α	6,4	41	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
CD19z/CD20z	IFN- γ	82 649,3	10	43 944,5	4	37 889,3	11
	IL-2	4497	9	1162,23	7	1867,5	3
	TNF- α	845,8	10	324,8	2	347,4	8
CD19 эпсилон-СО (Δ 181–185)/CD20z	IFN- γ	66 484,9	15	42 188,2	7	28 774,2	24
	IL-2	3146,7	6	1282,2	6	1397,4	16
	TNF- α	32,6	5	56,8	18	9,8	4
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	IFN- γ	61 523,6	2	42 984,9	3	28 355,8	3
	IL-2	3139	8	1503,8	8	1249,9	3
	TNF- α	18,9	3	16,0	5,0	19,2	8
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	IFN- γ	55 819,4	1	43 493,9	6	32 833,1	20
	IL-2	2184,5	2	1226,3	6	971,3	5
	TNF- α	487,6	6	294,2	1	247,7	1

Таблица 31.
Функциональная характеристика на день 1: анализ цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-2 в клеточных линиях Nalm6 МНС I/II КО, ST486 и K-562 с помощью MSD

Экспериментальные группы	Цитокины	Nalm6 МНС I/II КО Средн. пг/мл	% CV	ST486 Средн. пг/мл	% CV	K562 Средн. пг/мл	% CV
NTD	IFN- γ	17,7	64	176,7	16	146,7	27
	IL-2	<LOQ	<LOQ	29,58	41	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	3,8	14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
CD19z/CD20z	IFN- γ	62 212,8	4	62 767,7	4	12,8	12
	IL-2	2962	6	2939,7	6	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	679,4	8	627,2	2	<LOQ	<LOQ
CD19 эпсилон-СО (Δ 181–185)/CD20z	IFN- γ	48 370,7	6	48 368,5	6	177,6	67
	IL-2	1737,9	5	1485,9	10	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	56,8	14	12,6	4	<LOQ	<LOQ
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	IFN- γ	48 617,6	17	47 661,9	6	177,6	67
	IL-2	1387,2	6	1435,6	11	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	48,1	16	32,2	10	<LOQ	<LOQ
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	IFN- γ	42 380,4	12	45 879,7	3	159,8	64
	IL-2	1360	16	1175,9	5	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	353,5	7	329,5	4	<LOQ	<LOQ

[0306] Пролиферация на день 4. Для оценки пролиферации использовали разбавление метки Cell Trace™ Violet (CTV). Когда CAR-T-клетки делятся, каждое деление разводит краситель и, таким образом, более низкий MFI CTV по сравнению с клетками в день 0 указывает на пролиферацию. Минимальная гомеостатическая или антиген-независимая пролиферация наблюдается в контрольной группе NTD при культивировании отдельно или с антигенэкспрессирующими клеточными линиями. Все конструкции показали сопоставимые

уровни MFI при культивировании по клеточным линиям Raji, Raji CD19 KO, Raji CD20 KO, Nalm6 MHC I/II KO, ST486 и K-562. Полная сводная информация приведена в таблице 32.

Таблица 32. Данные определения функциональных характеристик на день 4: анализ пролиферации клеточных линий Nalm6 MHC I/II KO, Raji, Raji CD19 KO, Raji CD20 KO, ST486 и K562 посредством окрашивания Cell Trace™ Violet (CTV). Указанные значения представляют собой медиану кривых распределения CTV							
Экспериментальные группы	Raji	Raji CD19 KO	Raji CD20 KO	Nalm6 MHC I/II KO	ST486	K562	Только Т-клетки
NTD	16 924	17 079	18 037	18 326	17 914	17 752	27 568
CD19z/CD20z	12 518	12 155	11 410	11 670	10 262	20 396	31 696
CD19 эпсилон-СО (Δ181–185)/CD20z	11 910	11 384	10 193	11 005	12 433	19 049	26 396
CD19 эпсилон-СО (R183K)/CD20z	11 723	10 735	10 332	11 410	12 489	17 996	23 440
CD19 эпсилон-СО (S178N.R183K)/CD20z	10 425	9722	8689	8289	10 472	18 578	25 045

Пример 10

[0307] В следующем примере описаны анти-CD19 CAR, использующие сигнальные домены эпсилон-СО (Δ181–185), эпсилон-СО (R183K) и эпсилон-СО (S178N.R183K), которые демонстрируют значительно улучшенный контроль опухоли *in vivo* по сравнению с эталонным контролем анти-CD19 CAR, имеющим сигнальный домен CD3-дзета. Эти новые конструкторы CAR второго поколения с мутациями в сигнальном домене эпсилон CD3 также сравнивали с исходным конструктором CD3 эпсилон-СО. Все были успешно трансдуцированы и экспрессированы в первичных человеческих Т-клетках. *In vivo* исследования продемонстрировали превосходный контроль опухоли, экспансию и устойчивость CAR с помощью мутантных конструкторов эпсилон-СО и эпсилон-СО по сравнению с эталонными контролями CD3 дзета, демонстрируя, что анти-CD19 CAR, использующие сигнальный домен CD3 эпсилон, обладают повышенной эффективностью *in vivo*.

[0308] Разработка конструкторов. Анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR) второго поколения, далее именуется как дзета, с последовательностью ATGGCTCTGCCTGTGACCGCTCTGCTGTTGCCCTTGCTTTACTCCTGCACGCCGCAA GACCCGACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGAC

CGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTAT
CAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCA
CTCTGGCGTTCCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGAC
CATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACA
CCCTGCCTTACACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGC
GGATCTGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGC
AAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCCTGAGCGTTACATGCACT
GTGAGCGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCTGATCCGCCAACCTCCAAGA
AAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTC
CGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCC
TGAAGATGAACTCTCTCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACT
ACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACC
GTCTCCTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGT
GAAGGGAAAGCACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTG
GGTGCTCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGC
TTTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACA
TGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCT
CCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCAGGGTGAAGTTCTCAAGAAGCGCTGA
CGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAACCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAA
GAAGAGAGGAATACGACGTCCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGG
AGGAAAGCCAAGAAGAAAGAACCCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAAAAG
GACAAGATGGCTGAGGCTTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAGAAGAG
GAAAGGGACACGACGGACTGTACCAAGGCCTGAGCACCGCTACCAAGGACACCTA
CGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO: 91) в качестве

исходной матрицы для конструирования и синтеза дочерних конструкторов. Также были получены конструкторы, содержащие мутации в сигнальном домене эpsilon-CO, которые называются эpsilon-CO ($\Delta 181-185$), эpsilon-CO (R183K) и эpsilon-CO (S178N.R183K). Для получения «дочерних» конструкторов сигнальный белок CD3 дзета, начинающийся в нуклеиновых кислотах 3316–3651 исходной матрицы, заменяли следующими последовательностями (см. Фиг. 2):

Эpsilon-CO ($\Delta 181-185$):

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
CCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTC (SEQ ID NO: 79)

Эpsilon-CO (R183K):

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
CCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTCAATCAGAAGCGAATT
(SEQ ID NO: 80)

Эпсилон-СО (S178N.R183K)

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
CCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACAACGGTCTCAATCAGAAGCGAATT
(SEQ ID NO: 81).

[0309] Получение продуктов CAR Т-клеток. Материал, полученный с помощью афереза от здорового донора-человека. промывали, инкубировали с магнитными гранулами, связанными с антителом к CD8, и обрабатывали с использованием системы разделения клеток CliniMACS® (Miltenyi Biotech) согласно инструкциям производителя для обогащения CD8⁺ Т-клеток, которые затем криоконсервировали. Полученную отрицательную фракцию промывали и обрабатывали, как описано выше, с использованием магнитных гранул, связанных с антителом к CD4, для обогащения CD4⁺ Т-клетками, которые затем криоконсервировали. Выделенные CD4⁺ и CD8⁺ первичные человеческие Т-клетки размораживали в базальной среде OpTmizer STS™ для экспансии Т-клеток с добавлением 2,6% добавки для экспансии Т-клеток OpTmizer STS™, 2,5% заменителя иммунных клеток STS, 1% пенициллин/стрептомицин/L-глутамин и 305 международных единиц/мл человеческого интерлейкина (IL)-2, далее именуется полной средой OpTmizer™. Т-клетки ресуспендировали в полной среде OpTmizer™, содержащей 1,66 мкг/мл антитела к CD28 (клон 28.2) при плотности 1,0 x 10⁶ клеток/мл и затем высевали во флаконы Т-25, предварительно покрытые 1,23 мкг/мл антитела к CD3 (клон ОКТ3), чтобы индуцировать активацию Т-клеток (день 0). На день 1 после активации клетки трансдуцировали LVV, кодирующим родительский анти-CD19 CAR, или использовали дочерние конструкторы эпсилон-СО, эпсилон-СО (Δ181–185), эпсилон-СО (R183K) или эпсилон-СО (S178N.R183K) при MOI 5 или 10. Нетрансдуцированный (NTD) образец служил отрицательным контролем. Т-клетки промывали полной средой OpTmizer™ на день 3, нормализовали и размножали в течение дополнительных 6 дней (дни 3–9). В момент сбора клеток (день 9) клетки криоконсервировали для будущего применения. В несколько моментов времени во время экспансии (дни 3–9) количество клеток отбирали с использованием Vi-CELL, а плотность клеток нормализовали до 0,5 x 10⁶ клеток/мл путем добавления полной среды OpTmizer™. В этих временных точках среднее значение жизнеспособности клеток, диаметр и плотность клеток регистрировали на Vi-CELL.

[0310] Экспрессию CAR измеряли с помощью проточной цитометрии в дни 6 и 9. Т-клетки окрашивали панелью антител, конъюгированных с флуорофором и подвергали анализу с помощью проточной цитометрии для определения эффективности трансдукции и соотношений CD4+/CD8+ Т-клеток. Оценку экспрессии CAR (анти-CD19 CAR) обеспечивали флуорофор-конъюгированным КИР-1. Для обеспечения специфического анализа жизнеспособных клеток использовали фиксируемый краситель жизнеспособность клеток. Клетки окрашивали путем инкубации с соответствующей смесью антитела в течение 30 минут при 4 °С с последующими 2 промывками буфером для окрашивания, а затем фиксировали путем инкубации в параформальдегиде в фосфатно-солевом буферном растворе в течение 10 минут при комнатной температуре. Все данные проточной цитометрии собирали на приборе Fortessa-X20 и анализировали данные с использованием программного обеспечения FlowJo.

[0311] Подготовка совместного культивирования в день 0. Т-клеточные продукты, полученные из Т-клеток, полученных путем афереза от здорового донора, криоконсервировали в день сбора (день 9 получения). Затем Т-клеточные продукты размораживали и хранили в течение ночи в полной среде R-10% [среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина-стрептомицина, L-глутамина и NEPES] до начала совместного культивирования с клетками-мишенями. Непосредственно перед началом совместного культивирования аликвоту каждого образца Т-клеток инкубировали с панелью антител-флуорофоров и анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки эффективности трансдукции. Общую эффективность трансдукции оценивали с использованием КИР-1, специально изготовленного антитела, которое связывает линкер Whitlow между тяжелой и легкой цепями одноцепочечного переменного фрагмента (scFv). Затем Т-клетки маркировали реагентом CellTrace™ Violet (CTV) и затем промывали средой R-10%. Часть CTV-меченных образцов фиксировали и хранили при 4 °С до дня 4, когда образцы анализировали параллельно с образцами совместного культивирования дня 4 с помощью проточной цитометрии для оценки начальных уровней сигнала CTV (CTV Max). Т-клеточные продукты и клетки-мишени, экспрессирующие люциферазу, высевали вместе при различных соотношениях эффектора к мишени (Е : Т) в диапазоне от 3 : 1 до 1 : 243 в среде R-10% (день 0 совместного культивирования). Т-клеточные продукты последовательно разводили в 3 раза, а количество клеток-мишеней на лунку поддерживали постоянным на уровне 25 000 клеток. Положительные клетки-мишени включали Raji (CD19+), Nalm6 (CD19+), ST486 (CD19+), и Raji CD19 KO (CD19-) или K562 (CD19-). В качестве контроля, Т-клеточные продукты культивировали в отсутствие каких-либо клеток-мишеней (т. е. только Т-клетки) для

оценки базальных уровней Т-клеточной функции в отсутствие стимуляции антигена. Сокультуры инкубировали при 37 °С в течение 1 или 4 дней, а функциональные оценки проводили, как описано ниже.

[0312] Цитотоксичность на день 1 и день 4. Т-клеточноопосредованную цитотоксичность измеряли как функцию снижения целевого сигнала люциферазы в лунках совместного культивирования по сравнению с сигналом, испускаемым только клетками-мишенями. На дни 1 и 4 после начала совместного культивирования в лунки совместного культивирования добавляли субстрат D-люциферин в конечной концентрации 0,14 мг/мл, и планшеты инкубировали при 37 °С в темноте в течение 10 минут. Затем сразу считывали люминесцентный сигнал на мультимодальном микропланшетном фотометре PerkinElmer EnVision®. Т-клеточноопосредованную цитотоксичность рассчитывали следующим образом: % цитотоксичности = $[1 - \text{сигнал люциферазы (интересующего образца) / только контроля мишени}] * 100$.

[0313] Получение цитокинов на день 1. На день 1 после начала совместного культивирования супернатанты собирали и анализировали на уровне цитокинов с использованием набора для провоспалительной панели 1 (человек) Meso Scale Discovery V-PLEX в соответствии с инструкциями производителя. В частности, супернатанты из совместных культур Т-клеточных продуктов, которые высевали при соотношении E : T 1 : 1 с антигенэкспрессирующим Raji, Nalm6 и ST486, анализировали на уровне интерферона гамма (IFN- γ), IL-2 и секреции фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), опосредованной антигеном. Супернатанты из Т-клеток, культивируемых в отсутствие клеток-мишеней (только Т-клетки) или антигенотрицательных совместных культур (Raji CD19 KO или K562), анализировали параллельно для оценки базальных уровней продукции цитокинов в отсутствие антигена. Все образцы разводили так, чтобы они оставались в пределах диапазона обнаружения.

[0314] Пролиферация на день 4. На день 4 после начала совместного культивирования собирали Т-клеточные продукты, которые были посеяны на планшет в соотношении E : T 1 : 1, с клетками-мишенями, окрашивали с помощью панели антител-флуорофоров для идентификации Т-клеток и анализировали с помощью проточной цитометрии. Пролиферативную способность Т-клеточных продуктов определяли с помощью проточной цитометрии обусловленного делением клеток разведения красителя CTV в ответ на антигенэкспрессирующие клетки-мишени по сравнению с клетками-мишенями Т-клеточных продуктов, которые были культивированы отдельно (только Т-клетки), которые использовали для оценки базальных уровней гомеостатической пролиферации в отсутствие стимулов. CTV-меченные Т-клетки, которые фиксировали в день подготовки

совместного культивирования (CTV Max), анализировали с помощью проточной цитометрии параллельно для оценки интенсивности исходного сигнала CTV до пролиферации клеток.

[0315] Последовательное уничтожение. CAR-T-клетки продукта нормализовали для экспрессии CAR на день 0, аналогично подготовке совместного культивирования, описанной выше. Т-клетки совместно культивировали с антигенэкспрессирующей целевой линией Nalm6 при соотношении E : T 1 : 1 в среде R-10%. Через каждые 3–4 дня культуры подвергали воздействию дополнительных 25 000 клеток-мишеней Nalm6 (CD19+) в новой среде R-10%. Цитотоксичность (оцениваемая по сравнению с цитотоксичностью, описанной выше) и количества CD3+ Т-клеток (анализируемые на цитометре Attune) измеряли каждый раунд, когда добавляли больше клеток-мишеней. Для раундов 9–13 общий объем лунки разделяли на 1/3 перед добавлением клеток-мишеней Nalm6.

[0316] Получение CAR Т-клеток продукта. Количество клеток, жизнеспособность клеток и диаметр клеток отслеживали с дня 0 по день 9 для каждой из различных экспериментальных групп и обобщали в таблицах 33 и 34.

Экспериментальные группы	Количество клеток (10 ⁶)				Жизнеспособность (%)				Диаметр (мкм)			
	День 0	День 3	День 7	День 9	День 0	День 3	День 7	День 9	День 0	День 3	День 7	День 9
NTD	4,0	5,1	47,1	106,0	88,1	83	75,8	83,6	8,0	11,4	9,9	10,1
Дзета-СО	4,0	4,9	44,2	118,0	88,1	76,6	73,5	81,6	8,0	11,9	10,0	10,1
Эпсилон-СО	4,0	5,1	38,0	92,2	88,1	83,5	73,4	81,4	8,0	11,8	10,2	10,2
Эпсилон-СО (Δ181–185)	4,0	4,7	39,9	117,0	88,1	72,4	76,0	76,2	8,0	11,9	10,2	10,1
Эпсилон-СО (R183K)	4,0	4,6	37,8	92,5	88,1	82,6	71,9	82,7	8,0	12,4	10,1	10,1
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	4,0	5,0	47,1	120,2	88,1	73,8	76,7	85,2	8,0	11,7	10,2	10,1
Дзета 1xx	4,0	5,1	52,0	191,4	88,1	79,3	77,0	87,0	8,0	12,4	10,0	9,9

Экспериментальные группы	Количество клеток (10 ⁶)				Жизнеспособность (%)				Диаметр (мкм)			
	День 0	День 3	День 7	День 9	День 0	День 3	День 7	День 9	День 0	День 3	День 7	День 9
NTD	6,6	13,7	130,2	540,4	78,6	79,5	91,2	96,6	9,3	11,0	9,7	10,1
Эпсилон-СО	3,3	5,8	37,1	136,0	78,6	77,5	82,5	91,9	9,3	11,0	9,9	10,1
Эпсилон-СО (Δ181–185)	3,3	4,6	41,6	132,0	78,6	75,5	88,1	93,5	9,3	11,6	9,7	10,0
Эпсилон-СО (R183K)	3,3	5,3	35,4	122,0	78,6	76,8	83,5	92,1	9,3	11,1	9,9	9,8
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	3,3	5,6	44,0	158,2	78,6	75,8	89,4	93,6	9,3	10,6	9,8	10,1
Дзета 1xx	3,3	5,4	45,7	180,7	78,6	82,2	89,0	93,0	9,3	11,7	9,5	9,9

[0317] Эффективность трансдукции CAR Т-клеток продукта. Экспрессию CAR измеряли на день 6 или день 7 и день 9 получения с помощью окрашивания КИР-1 и последующего анализа проточной цитометрии (таблица 35). Экспериментальные группы показали сопоставимую экспрессию CAR на день 7 в диапазоне от 83% до 95% для донора 1 и на день 6 в диапазоне от 82% до 96% для донора 2. Экспрессия CAR оставалась относительно стабильной на день 9 для обоих доноров.

Экспериментальные группы	% трансдукции (Кip1+) — донор 1				% трансдукции (Кip1+) — донор 2			
	День 0	День 3	День 7	День 9	День 0	День 3	День 6	День 9
NTD	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Дзета-СО	Н/П	Н/П	96,5	93,1	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Эпсилон-СО	Н/П	Н/П	98,0	94,9	Н/П	Н/П	94,9	88,1
Эпсилон-СО (Δ181–185)	Н/П	Н/П	96,3	89,6	Н/П	Н/П	93,2	82,2
Эпсилон-СО (R183K)	Н/П	Н/П	98,3	95,2	Н/П	Н/П	95,1	88,0
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	Н/П	Н/П	97,1	89,7	Н/П	Н/П	95,5	84,6
Дзета 1xx	Н/П	Н/П	91,4	83,2	Н/П	Н/П	82,8	84,1

[0318] Эффективность трансдукции CAR Т-клеток продукта на день 0 совместного культивирования. После того, как образцы оттаивали и их оставляли на ночь, образец каждой экспериментальной группы окрашивали для оценки их процентного выхода и

экспрессии CAR. Затем группы нормализовали до самого низкого процента трансдукции (75% для донора 1 и 74% для донора 2) путем добавления NTD-клеток. Это делали для обеспечения того, чтобы все образцы имели одинаковое количество CAR+ в последующих анализах. Клеточные продукты успешно нормализовали и поддерживали в диапазоне от 68% до 73% для донора 1 и от 73% до 78% для донора 2 (таблица 36).

Экспериментальные группы	% трансдукции (Kip1+) — донор 1		% трансдукции (Kip1+) — донор 2	
	Пре-нормализация / выдерживание в течение ночи	Пост-нормализация	Пре-нормализация / выдерживание в течение ночи	Пост-нормализация
NTD	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Дзета-СО	90	72	Н/П	Н/П
Эпсилон-СО	92	68	85	77
Эпсилон-СО (Δ181–185)	83	72	72	78
Эпсилон-СО (R183K)	92	70	84	78
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	83	73	79	78
Дзета 1xx	75	69	79	73

[0319] Цитотоксичность. Данные от донора 1, полученные в день 1 (таблица 37) и в день 4 (таблица 38), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией Nalm6 без существенных различий между конструктами.

Экспериментальные группы	Соотношение E : T						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	16,1	12,3	11,9	14,1	4,3	5,9	7,1
	4,8	5,6	0,9	-10,6	-17,3	-12,2	-3,5
	3,9	-0,1	1,6	-7,3	-13,1	-9,5	0,2
Дзета-СО	99,9	98,8	82,8	56,2	25,3	17,1	8,9
	100	98,4	80,6	50,4	14,6	-4,8	0,8

Таблица 37.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 1: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при трехкратном повторении							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
	99,8	96,7	74,2	44,5	10,8	-3	2,3
Эпсилон-СО	99,9	97,9	80,9	51,8	21,7	17,5	10,8
	99,9	97,8	79,2	42,8	9,6	-10	0,9
	99,9	96	72,7	36,3	3,1	-5,9	4,7
Эпсилон-СО (Δ181–185)	99,9	98,1	80,9	48,3	17,3	13,5	2,3
	99,9	96,9	77,4	36,3	4,4	-11,7	-4,6
	99,9	95,2	71,7	28,6	-3,2	-12	0,1
Эпсилон-СО (R183K)	99,9	97,6	80,2	45,7	19,4	11,9	1,3
	99,9	97	79,1	43,1	8,9	-7,7	-4,5
	99,6	95,2	72,3	35,3	-3,1	-8	-3,2
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	99,9	99,3	87,2	55,4	16,8	4,2	-0,6
	99,9	99,1	84,1	48,8	12,5	-3,3	-5,5
	99,8	97,9	80,2	42,8	9,9	-5,8	0,1
Дзета 1xx	99,9	99,4	89	61,9	26,1	13,8	7,7
	100	99,2	86,4	55,6	16,9	-4,4	5,9
	99,8	97,5	81,6	44,5	12,5	-9,6	2,1

Таблица 38.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4 от донора 1: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при трехкратном повторении							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	15,2	0,8	-9,6	-10,7	-9,6	-11,1	0,6
	12,9	-2,6	-12,8	-13,2	-18,3	-14	-6,2
	11	0,3	-9,7	-12,6	-12,5	-11,7	-2,5
Дзета-СО	100	100	98,4	83,9	47,9	13,8	7,1
	100	100	98,6	84,6	52,3	14,9	9,4
	100	100	98,8	87,9	52,1	20,6	10,2
Эпсилон-СО	100	100	97,8	83,4	41,8	12,5	9,3
	100	100	98,3	81,2	44,8	7,8	5,3
	100	100	98,6	86,7	47	6,7	10,2
Эпсилон-СО (Δ181–185)	100	100	98,9	83,6	41,7	9,2	8,8
	100	100	98,6	85	41,2	11,6	1,2
	100	100	99,5	90	48,4	15	4,8
Эпсилон-СО (R183K)	100	100	98	81	45,6	18,1	4,4
	100	100	97,8	82,9	44,6	12,7	2,9
	100	100	98,9	84,6	45,5	14,7	2,9

Таблица 38.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4 от донора 1: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при трехкратном повторении							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	100	100	99,3	88	55,9	16,8	8,7
	100	100	99,6	89,9	56	15	4,7
	100	100	99,8	92,8	65,4	17,9	6,6
Дзета 1xx	100	100	99,4	90,5	56,4	18,5	6,7
	100	100	99,4	90,3	61,5	20,5	15
	100	100	99,5	91,8	65,8	26,7	15,4

[0320] Данные от донора 1, полученные в день 1 (таблица 39) и в день 4 (таблица 40), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией Raji без существенных различий между конструктами.

Таблица 39.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 1: процент цитотоксичности клеточной линии Raji при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	8,9	-2,3	-10,2	-10	-13,6	-23,6	-19,7
	15,9	7,2	-1	-15,6	-8,8	-32,8	-1,3
	8,1	2,1	-0,1	-26,4	-32,8	-34,7	2,2
Дзета-СО	85,6	58,5	19,7	-10,7	-16,1	-29,6	1,2
	86,2	59,2	29,7	-11,8	-19,9	-28,7	8,2
	83,5	51,6	18	-20,2	-27,9	-39,7	-5,8
Эпсилон-СО	80	50,4	17,3	-16,7	-20,5	-21,6	6,3
	78,8	50,4	20,6	-22,1	-23	-30,8	3,5
	76,8	44,6	19,7	-18,5	-36,4	-36,8	-7,7
Эпсилон-СО (Δ181–185)	80	48,6	21,4	-4,9	-19,6	-30,9	-20,1
	81,2	48,9	22,5	-23,1	-19,3	-33,1	1,2
	80	41,2	17,7	-30,4	-31,9	-36,7	-6,6
Эпсилон-СО (R183K)	78,3	45,9	21,1	-13,2	-21,6	-25,8	-10,1
	78	45,3	27,4	-11,3	-21,1	-24,6	7,3
	80	40,2	13,4	-28,5	-39	-37,8	1
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	87,4	57,6	27,1	-5,9	-19,8	-18,1	-4,1
	87,2	57,6	26,6	-13,4	-25,7	-25,4	3,6
	87,1	50,7	25,9	-32	-19,9	-25,3	1,3
Дзета 1xx	92,1	65,3	19,3	-4,6	-17,4	-19,1	-7,2
	93	67,5	37,6	-9,5	-13,5	-20,8	-5,7

Таблица 39.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 1: процент цитотоксичности клеточной линии Raji при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
	91,9	59,1	32	-19,6	-32,3	-34,1	3,9

Таблица 40.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4 от донора 1: процент цитотоксичности клеточной линии Raji при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	42,6	21,1	7,8	2,9	-3,2	-4,3	-5,1
	35,6	16,5	8,3	3	-3,9	-3,9	-2,9
	36,6	16,5	4	-2,9	-7,9	-7,1	-2,5
Дзета-СО	99,8	92,3	19,4	0,6	0,4	-3,7	-2,9
	99,8	93,9	14,1	-3,6	-4,7	-8,2	-1,5
	99,5	92,3	18,9	-0,3	-3,4	-9,3	-6,7
Эпсилон-СО	99,7	74	6,5	2,2	-4,5	-3,7	-5,3
	99,6	73,7	9,7	-6,7	-7,2	-4,5	-5,5
	99,7	76	12,4	0,1	-4,7	-6,8	-1
Эпсилон-СО (Δ181–185)	99,3	70,3	4,4	1,6	-4,2	-1,6	-3,8
	99,2	62,9	3,6	-1,8	-4,1	-4,7	-9,3
	99,3	65,3	5,4	3	-3,9	-7,2	-2
Эпсилон-СО (R183K)	99,8	76,5	11,6	3,1	-3,6	-8,1	-3,6
	99,8	73,1	5,1	0,6	2,9	3,1	-3
	99,8	81	7,8	0,7	-3,2	-9	0
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	99,7	91,1	12	0	-3,5	-9,9	4,7
	99,8	90,4	8,5	1,4	-2,1	-1	-6,8
	99,7	88,6	13,8	2,1	-1,2	-6,8	-6,9
Дзета 1xx	99,7	95,9	24,7	-3,6	0	-7,2	-3,1
	99,7	94,6	20,3	-1,4	-2,7	-8,4	-6,8
	99,7	95,6	24,4	-2,1	-5,6	-8,2	-9

[0321] Данные от донора 1, полученные в день 1 (таблица 41) и в день 4 (таблица 42), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией ST486 без существенных различий между конструктами.

Таблица 41.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 1: процент цитотоксичности клеточной линии ST486 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	12,4	0,8	-11,6	-16,5	-19,9	-19,6	-10,7
	18	4	-6,6	-14	-22,3	-19,1	-5,1
	8,5	1,8	-2,7	-11,1	-11,7	-6,8	-5,8
Дзета-СО	99,6	98,7	85,2	47,8	6,7	-14,8	-3,1
	99,7	98,5	84,2	47,7	6,9	-15,5	-2
	99,6	98,8	88,4	49,8	17	-3,2	-2,4
Эпсилон-СО	99,7	96,3	82	31,9	-0,3	-14,8	-5,1
	99,7	98,1	83,4	36,3	3	-15	-1,9
	99,6	95	83,2	48,4	10,8	-1,9	-4,1
Эпсилон-СО (Δ181–185)	99,4	98,1	80	32,5	-0,4	-15	-6,1
	99,3	95,5	78,1	39,8	0,1	-14,2	-6,7
	99,4	98,1	85,7	42,3	8,1	-8,7	-2,6
Эпсилон-СО (R183K)	99,4	95,2	79,5	37	-2,9	-13	-6,1
	99,4	96,9	80,4	31,1	-2,5	-13,5	-2,9
	99,6	95,9	83,4	47	11	-2,9	-3,4
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	99,6	98,9	87,7	49,9	8,2	-9,3	-5
	99,6	97	86,8	48,1	8	-5,6	-1
	99,6	99,1	90,3	54,8	19,7	2,2	1,2
Дзета 1xx	99,7	99,2	90,1	53,7	12,1	-12,3	-7,5
	99,7	98,9	91,6	55,9	6,1	-6	-2,6
	99,6	98,1	91,4	61,5	17,8	-3,5	-2,9

Таблица 42.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4 от донора 1: процент цитотоксичности клеточной линии ST486 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	66,1	-1,8	-21,9	-25,9	-31,6	-28,9	-6,5
	68,6	0,5	-12,3	-18,1	-23,8	-18,3	-5,8
	63,5	0,3	-13,1	-22,5	-29,3	-17,3	-7,3
Дзета-СО	100	99,9	99,9	94,8	64,2	30	22,4
	100	99,8	99,9	93,4	65,3	39,5	19,7
	99,9	99,9	99,9	93,7	68,8	31	21
Эпсилон-СО	99,9	100	100	92,6	55,3	16,4	14,9
	100	100	99,9	88	61,1	28	15,1
	99,9	100	99,9	92,6	58,8	23,1	17,4
Эпсилон-СО	100	99,9	100	93,8	63,3	29,2	6,4

Таблица 42.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4 от донора 1: процент цитотоксичности клеточной линии ST486 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
(Δ181–185)	99,9	100	99,9	91,1	62,5	34,2	4,3
	99,9	100	100	94,4	62,7	23,3	1
Эпсилон-СО (R183K)	100	99,9	100	92,8	56,3	18,9	1,4
	100	99,8	99,7	89,1	58,1	29,5	12,4
	99,9	99,9	100	90,9	60,5	23,7	11,8
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	100	100	99,9	97,2	71,2	29,4	14,6
	99,9	99,9	99,9	96,1	67,9	41,2	23,5
	99,9	99,9	99,9	97,6	75,2	40,2	7,4
Дзета 1xx	100	100	99,9	98,5	69,3	30,8	9,8
	99,9	99,9	99,9	98,1	74,8	31,8	12,6
	99,9	99,9	100	95,9	67,7	37,8	12,2

[0322] Данные от донора 2, полученные в день 1 (таблица 43) и в день 4 (таблица 44), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией Nalm6 без существенных различий между конструктами.

Таблица 43.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 2: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при трехкратном повторении							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	-4,3	3,4	-6	-4,7	-6,1	-6,2	-5,5
	2,2	4,5	-2,2	-3,4	-3,8	-4	-5,8
	1,8	7,5	2,4	-2,5	-3,5	-5,6	-6,6
Эпсилон-СО	97,1	86	55	20,4	4,1	-3,6	-3,4
	98,4	87,2	54,6	18,1	3,6	-,8	-3,2
	99,2	91,7	55,3	20,5	2,8	-4	-4,1
Эпсилон-СО (Δ181–185)	94,5	82,5	50,9	17	0,8	-2,1	-3,9
	98,1	83,2	50,9	20,1	0,6	-2,4	-2,5
	99,4	88,7	48,8	16,6	-0,6	-4,8	-4
Эпсилон-СО (R183K)	97,8	86	55,3	22,8	5,8	1,5	-6,3
	98,2	87,2	55,4	20,1	7,4	-1,5	-7
	99,6	90,5	56,4	19,2	4,3	-1,3	-4,2
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	96,5	86,7	54,3	22	4,4	-1,1	-2,4
	98,2	87,9	53,2	21	1,5	-1,1	-5,3
	99,7	92,4	56	17	3,3	-3,7	-5,5

Таблица 43.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 2: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при трехкратном повторении							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
Дзета 1xx	96,2	85	58,4	23,5	3,6	-0,5	-3,1
	96,9	84,9	55,7	24,7	5,5	-0,7	-5,3
	99,4	91,3	61,1	21,4	5,1	-3	-2,6

Таблица 44.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4 от донора 2: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при трехкратном повторении							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	23,4	-3	-6,1	-5,2	-4,4	-4	14,2
	26,2	0,9	-17,6	-13	-9,6	-11	13
	25	6	-14	-14,2	-7	-6,1	12,9
Эпсилон-СО	100	99,5	93,5	69,2	29,5	3,7	14
	100	99,8	96,7	67,2	28	-1,6	12
	100	100	99,1	78,5	18,4	-2,6	14,9
Эпсилон-СО (Δ181-185)	100	100	95,8	67	24,5	0	13,2
	100	99,9	96,1	73,9	25	-6	12,5
	100	100	99,4	77,4	22	-3,8	17,3
Эпсилон-СО (R183K)	100	99,7	94,4	73,7	31,8	2,1	12,4
	100	100	94,5	69,2	27,3	1,2	16,6
	100	100	99	78,4	24,4	-7,4	16
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	100	100	94,5	72,1	29,7	4	11
	100	100	96,2	75,3	24,5	-2	11,2
	100	100	99,5	82,5	30,7	-2,4	13,5
Дзета 1xx	100	99,8	95,1	71,3	30,6	6,4	11,7
	100	99,8	95,7	71,5	31,3	1	15,5
	100	100	99,1	81,3	29,7	8,1	18

[0323] Данные от донора 2, полученные в день 1 (таблица 45) и в день 4 (таблица 46), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией Raji без существенных различий между конструктами.

Таблица 45.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 2: процент цитотоксичности клеточной линии Raji при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	-7	2	-6,7	-1,5	-6,2	-9,2	-10,9
	-2,7	2	0,6	-4,7	-5,3	-5,6	-2,7
	-3,8	0,6	-2,1	-3,4	-4,7	-4	-3,1
Эпсилон-СО	62,7	37,6	13,6	1,8	-2,2	-4,1	-3,4
	64,2	33,8	13	2,6	-3,2	-5,5	-3,1
	67,6	35,3	12,1	-1,3	-5,2	-4,6	-2,3
Эпсилон-СО (Δ181-185)	54,7	32,1	11,4	-0,1	-3,1	-4,7	-5,2
	57,2	28,8	11,9	-0,2	-3,8	-6,3	-2,6
	60,3	31	9,4	1,3	-5,4	-2,9	-2,8
Эпсилон-СО (R183K)	64	38	9,6	1,9	-6,2	-5,7	-4,1
	64,4	35,8	15,5	1,3	-3,5	-6,2	-2,5
	68,8	39	11,1	2,3	-4,6	-4,6	-4,2
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	60,2	32,9	10,1	4,3	-3,2	-5,3	-2,8
	62,1	33,1	14,7	2,1	-2,1	-6,2	-1,5
	63,8	36,4	13,6	2,2	-4	-3,8	-2,8
Дзета 1xx	62,2	37,6	8,9	0,8	-4,7	-6,8	-6,6
	64,8	36,1	8,3	-0,8	-6	-6,1	-4,8
	67,6	35,9	9,7	-1	-6,6	-6,6	-4,2

Таблица 46.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4 от донора 2: процент цитотоксичности клеточной линии Raji при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	16,6	14,7	-5,4	-3,1	-5,5	-6,6	13,1
	10,2	6,6	-15,2	-11,5	-14	-13,1	9,8
	3,9	6,2	-22,6	-21,8	-16,5	-20	8,8
Эпсилон-СО	100	98,4	51,8	16,7	5,7	1,6	20,7
	100	98,9	64,7	25,1	0,6	-4	16,9
	100	98,5	67,8	23,9	1,3	-10,9	16,2
Эпсилон-СО (Δ181-185)	99,8	93	41,9	12,4	2,3	1,9	16,9
	99,7	94,2	46,5	12,2	-2,4	-6	14,1
	99,5	94	53,9	11,9	-8,7	-11,4	14,5
Эпсилон-СО (R183K)	100	98,1	52	19,3	4	-0,6	22
	100	98,6	58,4	16,5	3,8	-4,5	18,7
	100	98,1	65,6	20,3	-1,3	-9,1	18,7
	99,9	96,3	51	19,6	5,8	0,9	20,1

Таблица 46.							
Данные определения функциональных характеристик на день 4 от донора 2: процент цитотоксичности клеточной линии Raji при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	99,9	97,5	63,9	20,9	1	-4	15,9
	99,9	96,6	63,5	20,9	-0,2	-12,1	14,7
Дзета 1xx	100	95,2	43,6	18,1	4,4	3,2	18,9
	99,9	96,8	55,6	16,6	-1,7	-6,3	16,3
	99,9	97,6	62,2	11,6	-0,6	-9,1	12,9

[0324] Данные от донора 2, полученные в день 1 (таблица 47) и в день 4 (таблица 48), демонстрировали дозозависимую цитотоксичность по сравнению с антигенэкспрессирующей клеточной линией ST486 без существенных различий между конструктами.

Таблица 47.							
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 2: процент цитотоксичности клеточной линии ST486 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	9,1	5,5	-3,4	-2,9	-3,9	-5,1	-1,8
	8	7,8	-2,3	-1,9	-1,6	-1,3	-1,8
	3,9	6	0,3	-1,8	-5	-4	-6,9
Эпсилон-СО	95,8	83,2	52,4	17,8	4,1	-6,1	0,2
	96,1	83,5	48,3	17,9	1,9	-0,6	-1,8
	96,4	83	48,6	15,8	-4,3	-7,2	-1,2
Эпсилон-СО (Δ181–185)	94,6	81,1	43,9	16	3,3	2,1	-3,9
	95,6	80,6	41,6	12,6	0,9	-3,8	-2,2
	95,8	81,4	43,1	11,3	-1,9	-3,1	-4,7
Эпсилон-СО (R183K)	94,2	81,7	49,7	18,7	4,3	2,2	-3,9
	96,1	84,4	48,3	19,3	4,8	-1,4	-2,5
	95,5	81,2	49,2	17,3	-1,9	-3,3	-0,9
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	95,1	81,6	47	20,6	1,8	-4,8	-2,4
	95,7	81,6	49,1	16,7	4,7	1	1,9
	96,1	80,2	45,7	14,9	0,7	-3,3	0,7
Дзета 1xx	94,7	79,3	51,8	20,9	2,1	-4,9	-5
	95,6	82,8	50,7	20	4,1	-2,3	-0,8
	95,5	83	49,2	16,4	0,6	-4,2	-6,4

Таблица 48. Данные определения функциональных характеристик на день 4 от донора 2: процент цитотоксичности клеточной линии ST486 при трехкратных повторениях							
Экспериментальные группы	Соотношение Е : Т						
	3 : 1	1 : 1	1 : 3	1 : 9	1 : 27	1 : 81	1 : 243
NTD	60	10,6	-10,7	-15,7	-13,8	-12,4	0,3
	81,7	5,9	-21,7	-23,8	-27,8	-25,5	-13,6
	98,5	3,5	-13,6	-22,6	-28	-22,1	-15,7
Эпсилон-СО	100	99,9	97,7	81,4	44,9	6	5,2
	100	99,9	98,4	78,2	38,5	-0,3	-4,9
	100	99,9	99,2	82,5	28,7	-3,9	-2,1
Эпсилон-СО (Δ181–185)	100	100	98,6	81,2	27,5	1,4	9,9
	100	99,9	98,4	70,8	18,3	-7,3	0
	100	99,9	99,3	79,5	14,8	-9,9	0,9
Эпсилон-СО (R183K)	99,9	99,9	98,6	80,9	37,9	3,2	6,6
	100	99,9	98	73,2	18	0,4	3,4
	100	100	99,4	78,4	19,1	-7,9	4,4
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	99,9	99,9	98,2	80,6	35,2	5	8,7
	99,9	99,8	98,5	79,4	36,4	0,4	4
	100	99,9	99,3	85,3	20,8	-3,8	0,9
Дзета 1xx	99,9	99,9	97,2	77	36,2	11,2	7,5
	100	99,9	97,7	73,3	33,7	8,5	-7,2
	100	99,9	98,9	79,9	30	-10,7	-1,8

[0325] Получение цитокинов на день 1. Супернатант собирали из соотношения Е : Т 1 : 1 и анализировали с помощью MSD на секрецию IFN- γ , IL-2 и TNF- α . Анализ показал, что все конструкторы от донора 1 (таблица 49) и донора 2 (таблица 50) секретировали цитокины при совместном культивировании с антигенэкспрессирующими клеточными линиями Raji, Nalm6 и ST486. Все конструкторы эпсилон-СО секретировали аналогичные уровни цитокинов во всех клеточных линиях. Совместное культивирование с клеточными линиями Raji и Nalm6 вызывало более высокие уровни цитокинов по сравнению с уровнями, секретлируемыми клеточной линией ST486, однако общая иерархическая картина конструкторов была постоянной во всех клеточных линиях. С другой стороны, контрольная группа NTD не секретировала какие-либо измеряемые или значительные уровни цитокина при культивировании отдельно или с антигенэкспрессирующими клеточными линиями. Результаты измерения цитокинов $INF\gamma < 1,76$ пг/мл, IL-2 $< 0,890$ пг/мл и TNF $\alpha < 0,690$ пг/мл ниже предела количественного определения анализа (<LOQ).

Таблица 49.									
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 1: анализ цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-2 в клеточных линиях Nalm6, Raji и ST486 с помощью MSD									
Эксперимен- тальные группы	Цито- кины	Nalm6 Средн. пг/мл	% CV	Raji Средн. пг/мл	% CV	ST486 Средн. пг/мл	% CV	Только Т- клетки Средн. пг/мл	% CV
NTD	IFN- γ	80,34	47,31	107,1	34,0	48,8	74,4	9,5	0
	TNF- α	7,455	89,23	4,6	17,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	IL-2	<LOQ	<LOQ	25,8	10,7	7,6	0,0	<LOQ	<LOQ
Дзета-СО	IFN- γ	59 492	9,795	87 703,0	6,4	21 184,0	4,4	40,8	28,2
	TNF- α	787,7	2,009	886,7	4,6	159,4	6,6	<LOQ	<LOQ
	IL-2	2537	2,639	3946,0	5,8	355,9	2,9	<LOQ	<LOQ
Эпсилон-СО	IFN- γ	46 010	15,13	77 696,0	14,0	14 368,0	11,2	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	491	3,374	609,1	5,7	102,0	6,8	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1369	4,467	2492,0	5,4	176,7	14,1	<LOQ	<LOQ
Эпсилон-СО (Δ 181-185)	IFN- γ	39 789	19,61	42 344,0	1,6	9089,0	4,2	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	457,5	0,9958	439,8	6,0	67,5	5,0	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1233	3,23	1576,0	1,2	142,1	2,7	<LOQ	<LOQ
Эпсилон-СО (R183K)	IFN- γ	47 032	10,03	65 030,0	12,5	13 994,0	7,2	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	514,3	6,333	608,6	3,5	94,4	7,0	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1458	1,115	2253,0	5,5	130,4	10,1	<LOQ	<LOQ
Эпсилон-СО (S178N.R183 К)	IFN- γ	40 935	1,924	61 333,0	6,1	627,1	14,2	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	384	2,205	461,5	6,3	63,2	6,3	<LOQ	<LOQ
	IL-2	864,7	1,906	1729,0	4,8	101,1	9,6	<LOQ	<LOQ
Дзета 1xx	IFN- γ	47 208	8,041	87 703,0	12,9	6814,0	11,8	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	671	2,794	886,7	4,5	70,8	4,7	<LOQ	<LOQ
	IL-2	974,2	6,685	3946,0	5,5	44,2	8,1	<LOQ	<LOQ

Таблица 50.									
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 2: анализ цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-2 в клеточных линиях Nalm6, Raji и ST486 с помощью MSD									
Эксперимен- тальные группы	Цито- кины	Nalm6 Средн. пг/мл	% CV	Raji Средн. пг/мл	% CV	ST486 Средн. пг/мл	% CV	Тольк о Т- клетки Средн. пг/мл	% CV
NTD	IFN- γ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	IL-2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Эпсилон-СО	IFN- γ	22 590	6,817	25 597	13,68	7747	8,423	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	337	8,108	364,9	4,323	149	4,631	<LOQ	<LOQ
	IL-2	561,2	3,67	890,4	7,355	162,8	6,672	<LOQ	<LOQ

Таблица 50.									
Данные определения функциональных характеристик на день 1 от донора 2: анализ цитокинов IFN-γ, TNF-α, IL-2 в клеточных линиях Nalm6, Raji и ST486 с помощью MSD									
Экспериментальные группы	Цитокины	Nalm6 Средн. пг/мл	% CV	Raji Средн. пг/мл	% CV	ST486 Средн. пг/мл	% CV	Только Т-клетки Средн. пг/мл	% CV
Эпсилон-СО (Δ181–185)	IFN- γ	21 800	25,5	20 054	17,09	7024	24,7	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	334,4	8,974	304,8	2,257	114,8	7,499	<LOQ	<LOQ
	IL-2	738,4	3,888	863	8,073	177,6	13,02	<LOQ	<LOQ
Эпсилон-СО (R183K)	IFN- γ	20 059	15,68	25 805	9,312	7617	2,417	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	271,2	6,115	310,6	4,641	109,2	3,469	<LOQ	<LOQ
	IL-2	406,1	6,488	703,8	9,69	107,8	6,429	<LOQ	<LOQ
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	IFN- γ	21 088	7,545	23 819	3,331	6920	4,379	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	288,3	5,261	319,1	1,502	110,2	2,425	<LOQ	<LOQ
	IL-2	644,9	4,876	932,1	4,962	202,9	6,91	<LOQ	<LOQ
Дзета 1xx	IFN- γ	38 985	8,731	54 426	21,61	13 036	17,44	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	649,6	6,788	649,1	6,535	195,2	6,075	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1054	6,141	1589	6,852	225,1	4,065	<LOQ	<LOQ

[0326] Пролиферация на день 4. Для оценки пролиферации использовали разведение метки Cell Trace Violet (CTV). Когда CAR-T-клетки делятся, каждое деление разводит краситель и, таким образом, более низкий MFI CTV по сравнению с клетками в день 0 указывает на пролиферацию. Минимальная гомеостатическая или антиген-независимая пролиферация наблюдается в контрольной группе NTD при культивировании отдельно или с антигенэкспрессирующими клеточными линиями. Все конструкции показали сопоставимые уровни MFI при культивировании в сравнении с клеточной линией Raji, Nalm6 и ST486. Полная сводная информация приведена в таблице 51 для донора 1 и таблице 52 для донора 2.

Таблица 51.				
Данные определения функциональных характеристик на день 4: анализ пролиферации клеточных линий Raji, Nalm6 и ST486 с помощью Cell Trace Violet (CTV). Указанные значения представляют собой медиану кривых распределения CTV				
Экспериментальные группы	Raji	Nalm6	ST486	Только Т-клетки
NTD	12 156	14 618	14 754	19 120
Дзета СО	3926	3305	2373	19 256
Эпсилон-СО	4924	4594	2629	18 502
Эпсилон-СО (Δ181–185)	4462	4193	2849	18 502

Таблица 51. Данные определения функциональных характеристик на день 4: анализ пролиферации клеточных линий Raji, Nalm6 и ST486 с помощью Cell Trace Violet (CTV). Указанные значения представляют собой медиану кривых распределения CTV				
Экспериментальные группы	Raji	Nalm6	ST486	Только Т-клетки
Эпсилон-СО (R183K)	4841	4444	2788	19 165
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	4308	3561	3126	18 589
Дзета lxx	4272	4614	4041	19 576

Таблица 52. Данные определения функциональных характеристик на день 4: анализ пролиферации клеточных линий Raji, Nalm6 и ST486 с помощью Cell Trace Violet (CTV). Указанные значения представляют собой медиану кривых распределения CTV				
Экспериментальные группы	Raji	Nalm6	ST486	Только Т-клетки
NTD	18 282	18 552	17 666	20 460
Эпсилон-СО	2778	2797	2250	19 868
Эпсилон-СО (Δ181–185)	2766	2875	2235	20 968
Эпсилон-СО (R183K)	2902	2935	2370	20 814
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	2548	2577	2176	21 226
Дзета lxx	3101	4415	2595	25 142

[0327] Последовательное уничтожение. CAR-T-клетки продукта нормализовали для экспрессии CAR и совместно культивировали с антигенэкспрессирующей целевой линией Nalm6 при соотношении E : T 1 : 1. Каждые 3–4 дня культуры стимулировали более крупными клетками-мишенями Nalm6. Цитотоксичность (таблица 53) и количество CD3+ Т-клеток (таблица 54) измеряли каждый раунд, когда добавляли больше клеток-мишеней. После 14 раундов не было никаких существенных различий между конструктами.

Таблица 53. Данные последовательного уничтожения: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при шестикратном повторении														
Экспериментальные группы	Раунд													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
NTD	13,9	0	25,6	0	14,1	0	19,8	0	3,3	0	0	0	0	0
	12	0	20,3	0	4,3	0	15,4	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 53. Данные последовательного уничтожения: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при шестикратном повторении														
Экспериментальные группы	Раунд													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	7,1	0	23,4	0	1,4	0	12,8	0	0	0	0	0,2	0	
	8,5	0	20	0	0,5	0	11,4	0	5	0	13,2	0	3,6	0
	5,8	0	17,8	0	5,3	0	10,6	0	н/п	н/п	н/п	н/п	н/п	н/п
	9,2	0	18,5	0	7,2	0	14,4	0	2,2	0	26,4	0	6,3	0
Дзета-СО	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	99,6	97,2	14,2	0	3,6	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	100	99,9	77,5	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	100	98,1	44,1	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	99,8	98,7	17,4	0	3	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	100,1	92,5	0	0	10,3	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	100	99,9	99,5	45,1	0	0
Эпсилон-СО	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	99,2	92,9	0	0	2,1	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	99,6	91	0	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	99,9	92	0	0	1,1	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	100	91,9	0	0	11,2	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	100	93,8	0	0	15,1	0
	100	100	100	99,8	100	99,9	100,1	100,1	97,1	75,2	0	0	11,9	0
Эпсилон-СО (Δ181-185)	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	98,6	94,9	0	0	3,6	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	99,9	99,8	97,8	19,5	0	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	99,5	93,7	0	0	0	0
	100	99,9	100	100	100	100	100,1	100,1	99,9	98,1	0	0	1,7	0
	100	100	100	99,7	100	100	100,1	100,1	99,1	95	0	0	3,3	0
	100	100	100	99,9	100	100	100,1	100,1	99,8	95,7	0	0	6,1	0
Эпсилон-СО (R183K)	100	99,9	100	99,9	99,9	99,9	100	100,1	99	86,1	0	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	95,4	82,3	0	0	6,1	0
	99,9	100	100	100	100	100	100,1	100,1	98,9	86,7	0	0	0	0
	100	100	100	99,9	100	100	100,1	100,1	100,2	100	96,4	43,9	0	0
	99,9	100	100	99,9	100	100	100,1	100	97,7	71,4	0	0	5,2	0
	100	99,9	100	99,9	100	100	99,3	100	89,1	53,9	0	0	14,7	0
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	100	100	100	100	100	100	100	100	97,9	89,6	0	0	0,3	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100	98,8	89,9	0	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100	98,2	95,7	0	0	2,6	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100,1	98,8	86,7	0	0	11,2	0
	100	100	100	100	100	100	100,1	100	100,1	99,9	95,4	31,1	0	0
	100	100	100	99,9	100	99,9	100,1	100	97,2	81	0	0	13,9	0
Дзета 1xx	100	99,9	100	99,9	100	99,9	100,1	100,1	100,2	100	99,8	89,7	0	0
	100	99,9	100	100	100	100	100,1	100,1	100,1	99,6	47,4	0	0	0
	100	99,9	100	99,9	100	100	100	100,1	100,2	100	79	0	0	0
	100	99,9	100	99,9	100	100	100,1	100,1	100,1	99,7	89,6	66,8	0	0
	100	99,9	100	100	100	100	100,1	100,1	100,2	99,2	11,1	0	2,1	0

Таблица 53. Данные последовательного уничтожения: процент цитотоксичности клеточной линии Nalm6 при шестикратном повторении														
Экспериментальные группы	Раунд													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	100	99,9	100	99,9	100	99,9	100,1	100,1	100,2	100	98,1	83,6	0	0

Таблица 54. Данные последовательного уничтожения: количество CD3+ Т-клеток при совместном культивировании с клеточной линией Nalm6 при шестикратном повторении													
Экспериментальные группы	Раунд												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
NTD	88	25	53	98	22	25	105	9	28	68	304	759	608
	103	6	35	43	30	6	58	41	42	51	456	456	4556
	90	30	22	65	38	16	60	23	28	101	506	152	3189
	148	13	19	73	63	13	65	33	70	101	759	608	4101
	113	28	25	63	30	22	95	28	180	68	911	0	456
	110	25	50	53	58	19	38	28	28	17	101	304	2278
Дзета-СО	3200	10475	52000	39500	29500	25750	24925	14588	2531	4219	11846	2278	911
	5075	22950	57250	40000	29500	30000	41500	22163	9878	40500	3443	5164	7746
	7625	31750	59250	42250	33000	22725	35750	28088	3645	9720	8201	7290	8657
	8675	37000	48250	48000	34750	35750	43750	27938	2318	6278	4759	2278	4556
	5325	24275	47000	36250	34000	22175	30000	29025	3803	4556	962	1367	1823
	5925	24800	45500	44750	32750	23825	51750	26288	10598	82350	31590	9720	10024
Эпсилон-СО	3825	7775	24250	26000	23275	24700	19350	18825	1789	1148	1215	608	3645
	6300	10700	40000	43250	36250	25750	41500	28950	1676	439	2734	3645	2278
	7675	14325	58750	52000	46000	29250	41500	23850	2104	405	2025	2582	2734
	7850	12150	62500	34000	35250	24825	23975	28613	1373	4556	1215	608	1367
	6850	9175	19925	47500	35500	32250	24150	28688	2689	2599	6075	2886	2278
	5700	7275	19400	35000	18025	29000	28000	13538	349	439	1721	1367	911
Эпсилон-СО (Δ181-185)	6925	26250	26500	22850	21425	19400	19725	12263	2070	2261	3038	1671	4556
	9200	34000	26250	22350	34250	19200	22100	15600	8595	76275	4455	2582	3189
	11150	32750	35250	15100	26750	32750	19775	13050	923	1890	2025	1367	2278
	12400	38750	33500	13025	35500	25500	19225	16088	2711	7324	1418	759	2278
	11375	34000	17625	16175	32750	32000	23025	14325	1598	979	5063	1215	3645
	7900	26750	20800	17675	32750	24875	21500	13913	585	608	456	456	911
Эпсилон-СО (R183K)	3175	3250	7700	4225	38250	7000	12050	14250	878	945	1114	1519	2734
	4975	4850	18375	26750	32500	17200	15075	9900	765	675	810	911	911
	5225	9725	33000	26250	33000	18300	17200	14325	641	945	2025	1367	3645
	8975	9400	39750	37750	21125	19025	22475	27300	15638	74925	13365	10328	8201
	5275	4625	28500	20475	27250	21125	34500	14363	259	574	1114	1671	4556
	4525	7325	27500	26250	31750	31000	198	4875	169	709	557	759	3189
Эпсилон-СО (S178N.R183K)	9000	23525	28250	18250	27250	27500	26000	9788	1069	1485	2430	1215	2734
	13075	36500	20100	16800	35750	19950	21125	14850	1766	1384	1823	1823	2734
	16875	44250	16250	18500	33500	32500	38000	11363	2723	19305	11036	3645	3645

Таблица 54. Данные последовательного уничтожения: количество CD3+ Т-клеток при совместном культивировании с клеточной линией Nalm6 при шестикратном повторении													
Экспериментальные группы	Раунд												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	18575	42750	22500	10225	35250	45500	33500	21225	698	878	2025	3341	1367
	13400	38750	23550	17750	41000	21175	26000	33225	28013	92138	35438	20959	4101
	9725	36000	27500	21500	29250	34750	34000	15375	405	270	810	456	456
Дзета 1xx	4850	4475	20450	28000	40750	30000	34000	38625	33413	102600	112388	61965	6379
	7225	9700	34500	29000	24950	25500	73500	36413	9698	14546	6176	20351	4101
	8375	14725	46250	32500	31250	41000	38000	41250	15075	30848	5974	14884	7746
	7850	20700	42750	33000	30000	42500	64000	32025	11183	39150	34223	60750	30071
	6525	8425	40750	35250	45500	25500	48000	26438	7740	6008	7088	1974	456
	6625	8250	26750	44000	26750	23850	74250	62250	60525	96188	22984	12758	30983

Пример 11

[0328] Как описано в настоящем документе, оценивали другие белки, содержащие ITAM, которые могли заменить CD3 дзета в качестве сигнального домена в анти-CD19 химерном антигенном рецепторе (CAR) второго поколения и усиливать терапевтический потенциал CAR-Т-клеток продукта. Были разработаны 5 новых конструкций CAR второго поколения, в которых используется один из пяти новых сигнальных доменов, включая CD3 эпсилон, CD3 дельта, CD3 гамма и Dap12, в качестве заменителей CD3 дзета в эталонном контроле анти-CD19 CAR. Все были успешно трансдуцированы и экспрессированы в первичных человеческих Т-клетках. Эти новые конструкции CAR характеризовались посредством *in vitro* анализов и показали сопоставимые функциональные возможности CAR Т-клеток. *In vivo* исследования продемонстрировали превосходный контроль опухоли, экспансию и устойчивость CAR с помощью конструкций эпсилон-СО по сравнению с эталонными контролями CD3 дзета, демонстрируя, что анти-CD19 CAR, использующие сигнальный домен CD3 эпсилон, обладают повышенной эффективностью *in vivo*. В данном случае показано, что анти-CD19 CAR с использованием сигнальных доменов CD3 эпсилон, Dap12, CD3 дельта или CD3 гамма продемонстрировали значительно улучшенный контроль роста опухоли *in vivo* по сравнению с эталонным контролем анти-CD19 CAR с сигнальным доменом CD3 дзета.

[0329] Разработка конструкций. Анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR) второго поколения, далее именуется как дзета, с последовательностью ATGGCTCTGCCTGTGACCGCTCTGCTGTTGCCCTTGCTTTACTCCTGCACGCCGCAAG ACCCGACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGAGACCGA GTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACA

AAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGC
GTTCCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCA
ACCTGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTA
CACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAA
GCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCGGAC
CTGGATTGGTGGCCCCCTCACAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTGTC
CCTTCCTGACTACGGCGTTTCCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGG
CTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGA
CTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCCTGAAGATGAACTCTCTCC
AAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCT
ACGCTATGGACTACTGGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCT
GGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACCTGTGCC
CTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTGGGAGGAG
TGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTAGAAAGC
AAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGA
CCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAA
GCAGGGTGAAGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAACC
AACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATACGACGTCCTGGACAAG
AGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAGCCAAGAAGAAAGAACCCTCAAGA
GGGCCTGTACAACGAGCTGCAAAAGGACAAGATGGCTGAGGCTTACTCCGAGATCGG
AATGAAGGGAGAGAGAAGAAGAGGAAAGGGACACGACGGACTGTACCAAGGCCTGA
GCACCGCTACCAAGGACACCTACGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG

(SEQ ID NO: 91) в качестве исходной матрицы для конструирования и синтеза семи дочерних конструкций. Далее эти конструкции называются дзета 1xx, эпсилон, дельта, гамма, Dap12, дзета-СО, и эпсилон-СО. Для получения «дочерних» конструкций сигнальный белок CD3 дзета в нуклеиновых кислотах 3316–3651 исходной матрицы, заменяли следующими последовательностями (см. Фиг. 3);

Дзета 1xx:

CGGGTGAAGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAACCA
ACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATACGACGTCCTGGACAAG
AGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAGCCAAGAAGAAAGAACCCTCAA
GAGGGCCTGTTTAAACGAGCTGCAAAAGGACAAGATGGCTGAGGCTTTCTCCGAGAT
CGGAATGAAGGGAGAGAGAAGAAGAGGAAAGGGACACGACGGACTGTTCCAAGG
CCTGAGCACCGCTACCAAGGACACCTTCGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCC
TAGG (SEQ ID NO: 82)

Эпсилон:

AAGAACCGGAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACAAGAGGTGCTGGTGCTGGCGGCA
GACAGAGAGGCCAGAACAAGAAAGACCTCCTCCTGTGCCTAATCCTGACTACGAG
CCCATCCGGAAGGGCCAGAGAGATCTGTACAGCGGCCTGAACCAGCGGCGGATT
(SEQ ID NO: 53)

Дельта:

GGACACGAAACAGGCAGACTTTCTGGCGCCGCTGATACACAGGCCCTGCTGAGAAA
CGACCAGGTGTACCAGCCTCTGAGAGACAGAGATGACGCCAGTACTCTCACCTCG
GCGGCAATTGGGCCAGAAACAAG (SEQ ID NO: 83)

Гамма:

GGACAGGATGGCGTCAGACAGAGCAGAGCCAGCGACAAGCAAACCCTGCTGCCTA
ACGACCAGCTGTACCAGCCTCTGAAGGACAGAGAGGACGACCAGTACAGCCATCTG
CAGGGCAACCAGCTGCGGAGAAAC (SEQ ID NO: 84)

Дар12:

TACTTCCTGGGCAGACTGGTGCCTAGAGGAAGAGGAGCTGCTGAGGCTGCTACCAG
AAAGCAGAGAATCACCGAGACCGAGAGCCCTTACCAGGAGCTGCAGGGACAGAGA
AGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAGAGACCTTACTACAAG (SEQ ID NO: 85)

Дзета-СО:

AGAGTTAAGTTCAGCAGGAGCGCCGACGCACCTGCCTACCAaCAAGGGCAGAATCA
ACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAGGAATACGATGTGCTGGACAAG
AGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAACCTAGAAGAAAGAACCCCCAGG
AGGGCCTGTATAATGAGCTCCAGAAGGATAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATC
GGCATGAAGGGCGAAAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGACGGCCTCTACCAGGGCT
TAAGCACAGCTACTAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAAGCTCTGCCCCCT
AGA (SEQ ID NO: 86)

Эпсилон-СО:

AAGAACCGCAAAGCAAAGGCCAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGAC
GACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAA
CCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTCAATCAGAGGCGAATT
(SEQ ID NO: 54)

[0330] Получение продуктов CAR Т-клеток. Материал, полученный с помощью афереза от здорового донора-человека. промывали, инкубировали с магнитными гранулами, связанными с антителом к CD8, и обрабатывали с использованием системы разделения клеток CliniMACS® (Miltenyi Biotech) согласно инструкциям производителя для обогащения CD8+ Т-клеток, которые затем криоконсервировали. Полученную

отрицательную фракцию промывали и обрабатывали, как описано выше, с использованием магнитных гранул, связанных с антителом к CD4, для обогащения CD4⁺ Т-клетками, которые затем криоконсервировали. Выделенные CD4⁺ и CD8⁺ первичные человеческие Т-клетки размораживали в базальной среде OpTmizer™ CTS для экспансии Т-клеток с добавлением 2,6% добавки для экспансии Т-клеток OpTmizer CTS™, 2,5% заменителя иммунных клеток CTS, 1% пенициллин/стрептомицина/L-глутамин и 305 международных единиц/мл человеческого интерлейкина (IL)-2, далее именуется полной средой OpTmizer™. Т-клетки ресуспендировали в полной среде OpTmizer™, содержащей 1,66 мкг/мл антитела к CD28 (клон 28.2) при плотности 1,5 × 10⁶ клеток/мл и затем высевали в колбу Т-75, предварительно покрытую 1,23 мкг/мл антитела к CD3 (клон ОКТ3), чтобы индуцировать активацию Т-клеток (день 0). В день 1 после активации клетки либо трансдуцировали LVV, кодирующим исходный анти-CD19 CAR, либо использовали дочерние конструкции эпсилон, дельта, гамма и Dap12 при MOI 20. Дополнительные экспериментальные группы, состоящие из конструкций дзета-СО и эпсилон-СО, трансдуцировали в MOI 5, а нетрансдуцированный (NTD) образец служил отрицательной контрольной пробой. Т-клетки промывали полной средой OpTmizer™ на день 3, нормализовали и размножали в течение дополнительных 4 дней (дни 3–7). В момент сбора клеток (день 7) клетки криоконсервировали для будущего применения. В несколько моментов времени во время экспансии (дни 3–7) количество клеток отбирали с использованием Vi-CELL, а плотность клеток нормализовалась до 0,5–1 × 10⁶ клеток/мл путем добавления полной среды OpTmizer™. В этих временных точках среднее значение жизнеспособности клеток, диаметр и плотность клеток регистрировали на Vi-CELL.

[0331] Экспрессию CAR измеряли с помощью проточной цитометрии в дни 6 и 7. Т-клетки окрашивали панелью антител, конъюгированных с флуорофором и подвергали анализу с помощью проточной цитометрии для определения эффективности трансдукции и соотношений CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток. Оценку экспрессии CAR (анти-CD19 CAR) обеспечивали флуорофор-конъюгированным KIP-1. Для обеспечения специфического анализа жизнеспособных клеток использовали фиксируемый краситель жизнеспособность клеток. Клетки окрашивали путем инкубации с соответствующей смесью антител в течение 20 минут при 4 °С с последующими 2 промывками буфером для окрашивания, а затем фиксировали путем инкубации в 0,6% параформальдегида в фосфатно-солевом буферном растворе или сбалансированном солевом растворе Хэнка в течение 10 минут при комнатной температуре. Все данные проточной цитометрии собирали на приборе FACS Canto и анализировали данные с использованием программного обеспечения FlowJo.

[0332] Подготовка совместного культивирования в день 0. Т-клеточные продукты, созданные из Т-клеток, полученных путем афереза от здорового донора, криоконсервировали в день сбора (день 7 получения). Т-клеточные продукты последовательно размораживали и оставляли в течение ночи в полной среде OpTmizer™ до начала совместного культивирования с клетками-мишенями. Непосредственно перед началом совместного культивирования аликвоту каждого образца Т-клеток инкубировали с панелью антител-флуорофоров и анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки эффективности трансдукции. Общую эффективность трансдукции оценивали с использованием KIP-1, специально изготовленного антитела, которое связывает линкер Whitlow между тяжелой и легкой цепями одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv). Затем Т-клетки маркировали реагентом CellTrace™ Violet (CTV), после чего промывали с помощью R-10% среды [среды RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина-стрептомицина, L-глутамина и HEPES]. Часть CTV-меченных образцов фиксировали и хранили при 4 °С до дня 4, когда образцы анализировали параллельно с образцами совместного культивирования дня 4 с помощью проточной цитометрии для оценки начальных уровней сигнала CTV (CTV Max). Т-клеточные продукты и клетки-мишени, экспрессирующие люциферазу, высевали вместе при различных соотношениях эффектора к мишени (E : T) в диапазоне от 3 : 1 до 1 : 243 в среде R-10% (день 0 совместного культивирования). Т-клеточные продукты последовательно разбавляли в 3 раза, а количество клеток-мишеней на лунку поддерживали постоянным при 20 000 клеток. Положительные клетки-мишени включали Nalm6 (CD19+) и ST486 (CD19+). В качестве контроля, Т-клеточные продукты культивировали в отсутствие каких-либо клеток-мишеней (т. е. только Т-клетки) для оценки базальных уровней Т-клеточной функции в отсутствие стимуляции антигена. Сокультуры инкубировали при 37 °С в течение 1 или 4 дней, а функциональные оценки проводили, как описано ниже.

[0333] Цитотоксичность день 1. Т-клеточноопосредованную цитотоксичность измеряли как функцию снижения целевого сигнала люциферазы в лунках совместного культивирования по сравнению с сигналом, испускаемым только клетками-мишенями. На дни 1 и 4 после начала совместного культивирования в лунки совместного культивирования добавляли субстрат D-люциферин в конечной концентрации 0,14 мг/мл, и планшеты инкубировали при 37 °С в темноте в течение 10 минут. Затем сразу считывали люминесцентный сигнал в многомодовом считывателе микропланшетов VarioSkан™ LUX или VarioSkан® Flash. Т-клеточноопосредованную цитотоксичность рассчитывали следующим образом:

% цитотоксичности = $[1 - \text{сигнал люциферазы (интересующего образца / только контроля мишени)}] * 100$.

[0334] Получение цитокинов на день 1. На день 1 после начала совместного культивирования супернатанты собирали и анализировали на уровни цитокинов с использованием набора для провоспалительной панели 1 (человек) Meso Scale Discovery V-PLEX в соответствии с инструкциями производителя. В частности, супернатанты из совместных культур Т-клеточных продуктов, которые высевали при соотношении Е : Т 1 : 1 с антигенэкспрессирующим Nalm6 и ST486, анализировали на уровни интерферона гамма (IFN- γ), IL-2 и секреции фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), опосредованной антигеном. Супернатанты из Т-клеток, культивируемых в отсутствие клеток-мишеней (только Т-клетки), анализировали параллельно для оценки базальных уровней продукции цитокинов в отсутствие антигена. Все образцы разводили так, чтобы они оставались в пределах диапазона обнаружения.

[0335] Пролиферация на день 4. На день 4 после начала совместного культивирования собирали Т-клеточные продукты, которые были посеяны на планшет в соотношении Е : Т 1 : 1, с клетками-мишенями, окрашивали с помощью панели антител-флуорофоров для идентификации Т-клеток и анализировали с помощью проточной цитометрии. Пролиферативную способность Т-клеточных продуктов определяли с помощью проточной цитометрии обусловленного делением клеток разведения красителя CTV в ответ на антигенэкспрессирующие клетки-мишени по сравнению с клетками-мишенями Т-клеточных продуктов, которые были культивированы отдельно (только Т-клетки), которые использовали для оценки базальных уровней гомеостатической пролиферации в отсутствие стимулов. CTV-меченные Т-клетки, которые фиксировали в день подготовки совместного культивирования (CTV Max), анализировали с помощью проточной цитометрии параллельно для оценки интенсивности исходного сигнала CTV до пролиферации клеток.

[0336] Исследование *in vivo* (дозировка 1 — дозировка 2 — дозировка 3). Были приготовлены анти-CD19 CAR Т-клетки и клетки NTD, а замороженные клетки в криопробирках были доставлены на сухом льду. После получения криопробирки хранили в жидком азоте. За день до инъекции пробирки удаляли из криохранилища, размораживали на водяной бане при 37 °C, и клетки ресуспендировали в предварительно нагретой среде, содержащей 305 международных единиц (МЕ)/мл интерлейкина (IL)-2. Клеточные суспензии центрифугировали при 400 × g в течение 5 минут при комнатной температуре и супернатант аспирировали и отбрасывали. Затем клеточные осадки ресуспендировали в полной среде OpTmizer™ и 305 МЕ/мл IL-2 и аликвоту клеточной суспензии анализировали

для подсчета и определения жизнеспособности клеток с использованием автоматического счетчика клеток Vi-cell BLU с помощью метода исключения трипанового синего красителя. Затем клетки ресуспендировали при $2,0\text{--}5,0 \times 10^6$ клеток/мл в полной среде OpTmizer™ и 305 МЕ/мл IL-2, переносили в культуральные колбы и культивировали в инкубаторе в течение ночи при $37\text{ }^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$. В день инъекции после ресуспендирования клеток аликвоту каждого условия подсчитывали с использованием автоматического счетчика клеток Vi-CELL BLU для определения концентрации клеток и преинъекционной жизнеспособности клеток. Затем суспензии клеток центрифугировали при $400 \times g$ в течение 5 минут при $4\text{ }^\circ\text{C}$. Супернатанты аспирировали и отбрасывали, а клеточные осадки ресуспендировали в холодном PBS. После исследований тестировали различные дозы CAR T-клеток:

для дозирования 1: 1 доза $1,0 \times 10^7$ CAR клеток на группу,

для дозирования 2: 1 доза $2,0 \times 10^6$ CAR клеток на группу,

для дозирования 3: 3 дозы CAR⁺ клеток на группу: $1,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^5$ или $4,0 \times 10^4$.

[0337] Экспериментальные группы и нормализация дозы. Для каждого исследования у мышей в каждой из экспериментальных групп вводили одинаковое общее количество T-клеток. Дозы, вводимые каждой экспериментальной группе, нормализовали для доставки одного и того же общего количества T-клеток для каждой группы на основе эффективности трансдукции анти-CD19 CAR.

[0338] Билюминесцентная визуализация *in vivo*. BLI *in vivo* проводили с использованием системы оптической визуализации IVIS Lumina S5 (Xenogen, Alameda, CA). Визуализировали по пять животных в момент времени под газовым наркозом примерно от 1% до 2% изофлурана. Каждой мышце вводили внутрибрюшинно (в/б) 150 мг/кг D-люциферина и визуализировали в положении лежа в течение 15 минут после инъекции. Использовали среднюю сортировку чипа прибора с зарядовой связью (CCD), при этом время воздействия регулировали (от 2 секунд до 2 минут) для получения по меньшей мере нескольких сотен подсчетов от диссеминированных опухолей, которые наблюдались у каждой мыши на изображении, и чтобы предотвратить насыщение чипа CCD. Изображения BLI получали дважды в неделю. Изображения анализировали с использованием программного обеспечения Living Image версии 4.7.3 (Xenogen, Alameda, CA). Интересующие области (ROI) фиксированного объема всего тела помещали на изображения в положении лежа для каждого отдельного животного и маркировали на основе идентификации животных. Общий поток (фотоны/секунду) рассчитывали и экспортировали для всех ROI.

[0339] Анализ методом кЦПЦР и проточной цитометрии *ex vivo*. Недельный объем крови 100 мкл собирали через ретро-орбитальную пазуху в пробирках с покрытием EDTA и либо

непосредственно замораживали для последующего анализа кцПЦР, либо анализировали с помощью проточной цитометрии. Пробы отбирали начиная через 24 часа после инъекции Т-клеток и продолжали еженедельно в течение всей продолжительности исследования. Для кцПЦР очистку геномной ДНК проводили с использованием KingFisher™ Flex (небольшой объем) в соответствии с инструкциями производителя, затем проводили кцПЦР на очищенной ДНК посредством внутренних протоколов Kite и приборов Bio-Rad. Для анализа методом проточной цитометрии цельную кровь окрашивали с использованием антител, конъюгированных с флуорофором, следуя внутренним протоколам Kite, и затем анализировали на проточном цитометре. Абсолютное количество клеток в крови определяли с помощью CountBright™ Absolute Counting Beads для проточной цитометрии.

[0340] Исследование *in vivo* (дозировка 1). В этом исследовании оценивали потенциальное антиген-независимое размножение Т-клеток *in vivo* и функциональность оставшихся CAR Т-клеток. Изменение массы тела в различные моменты времени от начального значения в начале лечения обобщено в таблице 62. Все мыши из всех групп набрали массу тела с течением времени до дня 49, что согласуется с отсутствием токсичности. На день 49 4 мышей из каждой группы (за исключением группы эpsilon-CO) подвергали эвтаназии для анализа *ex vivo* и на день 50 другим 4 мышам из каждой группы внутривенно (в/в) имплантировали опухолевые клетки с двойным нокаутом (DKO) Nalm6-luc MHC I/II ($5,0 \times 10^5$ в 100 мкл) и изменение массы тела для всех оставшихся мышей регистрировали до конца исследования на день 85. С дня 50 до дня 85 мыши из группы эpsilon-CO демонстрировали увеличение массы тела до конца исследования, но у мышей из группы, получавшей носитель, NTD и дзета-CO, набор массы тела был сниженным в связи с опухолевой нагрузкой, по достижении конечной точки исследования на день 70.

[0341] Опухолевую нагрузку оценивали с помощью измерений BLI в различные моменты времени (таблица 63). БиOLUMиНесцентная визуализация (BLI) для каждой экспериментальной группы обобщена в таблице 63. В контрольной группе, получавшей носитель, или группах, которые получали либо NTD-клетки, либо CAR Т-клетки дзета-CO на день 0, рост опухолей был неконтролируемым, и животные и подверглись эвтаназии из-за высокой опухолевой нагрузки на день 70 после инфузии Т-клеток (день 20 после имплантации опухолевых клеток). Только группа эpsilon-CO не показала роста опухоли до завершения исследования на день 85 (35 дней после имплантации опухолевых клеток), демонстрируя, что Т-клетки эpsilon-CO по-прежнему являются устойчивыми и сохраняют свою функциональность и противоопухолевую активность в отсутствие антигена в течение 50 дней и после этого способны эффективно устранять опухолевую нагрузку, значительно улучшая контроль опухоли по сравнению с эталонным контролем дзета-CO.

Таблица 62

ДНЕЙ ПОСЛЕ ИНФУЗИИ Т-КЛЕТОК	НЕСУЩАЯ СРЕДА							NTD								
	5	-3,2	-5,5	4	0,5	2,1	3,5	-8,1	2,1	2,7	2,7	0,5	0,5	4,2	2,5	2
8	4,9	2,5	2	1,4	4,7	0,5	-4,5	3,2	3,2	3,2	0,5	-1	4,2	2	-1	1,6
11	12,4	0,5	6,5	3,8	6,8	2,5	-2	8,5	5,9	6,5	3,6	6,2	7,3	5	5,4	4,3
13	13	5,5	6	4,3	9,5	1	-2	9,6	5	7,5	3,6	5,2	9,4	5	6,4	4,9
15	11,9	9	9,5	4,3	9,5	7,1	16,2	13,8	6,4	10,8	5,9	8,8	9,9	7	7,8	9,2
22	11,4	12,6	10,1	13,5	15,3	15,2	3	18,6	7,8	12,9	10,4	13,5	9,9	13,6	12,7	21,7
27	11,9	10,1	10,1	11,5	17,9	-1	9,6	13,8	8,2	13,4	9	10,9	14,7	11,1	11,3	21,7
29	16,8	11,6	12,6	15,9	21,6	14,1	5,6	19,1	12,3	16,1	14	16,6	13,1	13,1	11,3	25
33	13,5	12,6	12,1	14,9	22,6	10,1	6,1	18,6	13,7	15,6	11,7	17,6	13,1	13,1	11,3	16,8
36	14,1	13,1	10,6	13,9	22,6	11,1	7,1	19,7	13,2	15,1	12,2	16,6	12	13,1	9,8	16,8
42	11,4	15,6	16,1	13,5	23,7	13,6	10,1	21,3	16,9	18,3	15,3	18,7	18,3	15,6	13,2	14,1
48	20	15,6	15,1	20,2	25,3	14,1	6,1	19,1	14,2	18,8	11,3	20,7	17,8	13,6	13,2	14,1
56					28,4	21,2	5,6	22,3					15,7	15,6	17,6	16,8
64					26,8	22,7	5,6	19,7					15,2	15,6	12,7	19,6
70					23,7	16,2	3	17					13,6	12,6	15,2	16,8
80																
85																

Таблица 62 (продолжение)

ДЗЕТА-СО								ЭПСИЛОН-СО								
-5,7	-2,5	1,6	-4	0	2	-1	0	-6,1	-3,1	-2	0	-4,3	1,9	2	6,9	
3,1	-0,5	8,6	0,5	2,5	-11,6	-10	-12,6	0,4	-1	-1,9	-1	1,2	0,5	-4	6,5	
-4,1	-0,5	10,2	2,5	3,5	-10,6	-0,5	-1,5	4	2,5	2,4	1	7,1	6,4	5,5	12,9	
-1,6	0,5	10,8	2	9,1	-7	-3	2,5	6,2	2,5	2,9	2	10	5,4	4	13,9	
4,7	0,5	10,2	6	14,1	4	3	7,6	7,5	3	2,9	6,1	11,2	8,4	6,5	17,4	
11,4	1	19,9	11,6	16,2	9	5	12,1	14,1	7,6	7,7	7,6	17,1	12,3	11,9	20,9	
7,3	-2	18,8	4,5	15,7	14,6	9,5	8,1	12,3	10,1	8,7	12,6	15,3	11,8	12,4	24,4	
11,9	3,5	22	8	17,2	14,1	8,5	16,7	13,7	11,6	9,2	14,6	22,4	13,8	13,9	11,9	
6,7	3,5	17,2	9	14,6	13,6	6,5	17,7	13,2	13,1	10,1	12,1	22,9	14,3	13,4	11,9	
4,7	4	15,6	8	15,7	14,1	5	18,7	12,3	14,1	8,2	13,1	27,1	16,3	12,9	14,4	
10,9	6	16,1	12,1	18,2	14,6	6,5	22,7	14,5	16,2	9,2	9,1	25,3	15,8	13,9	20,9	
8,3	5,5	17,2	11,1	20,2	8,5	8,5	22,7	18,5	12,6	13	11,6	26,5	16,3	15,4	6,5	
				12,1	13,6	11	21,2	21,1	16,2	15,5	21,7	27,6	25,1	21,9	11,9	

ДЗЕТА-СО								ЭПСИЛОН-СО							
				7,1	10,6	7	12,6	19,8	12,1	15,5	16,7	31,2	18,7	9,5	15,4
				7,6	11,1	6,5	14,6	18,9	11,1	16,4	16,2	32,4	21,2	9,5	14,4
								18,5	13,6	15,0	18,2	34,7	25,6	11,9	20,9
								19,8	12,6	14,0	16,2	35,9	26,6	12,9	22,4

Таблица 63

ДНЕЙ ПОСЛЕ ИНФУЗИИ Т- КЛЕТОК	НЕСУЩАЯ СРЕДА				NTD			
	56	1,64E+06	1,64E+06	1,39E+06	1,92E+06	1,67E+06	1,53E+06	1,29E+06
60	3,08E+07	4,13E+07	2,87E+07	1,85E+07	3,86E+07	2,04E+07	2,29E+07	3,55E+07
67	7,01E+09	6,49E+09	5,63E+09	9,02E+09	4,68E+09	6,05E+09	6,97E+09	6,53E+09
70	1,56E+10	2,06E+10	9,75E+09	1,65E+10	1,80E+10	1,41E+10	1,15E+10	1,32E+10
81								
85								

Таблица 63 (продолжение)

ДЗЕТА-СО				ЭПСИЛОН-СО			
1,57E+06	1,72E+06	1,19E+06	1,22E+06	7,20E+05	7,64E+05	9,01E+05	7,34E+05
2,12E+07	8,97E+06	2,17E+07	2,80E+07	8,50E+05	8,22E+05	7,74E+05	9,29E+05
3,36E+09	4,02E+09	5,87E+09	3,91E+09	7,29E+05	7,71E+05	6,80E+05	6,34E+05
1,25E+10	1,09E+10	1,29E+10	1,13E+10	7,38E+05	8,04E+05	8,00E+05	5,38E+05
				6,50E+05	7,19E+05	6,75E+05	5,52E+05
				6,84E+05	6,51E+05	6,59E+05	7,65E+05

[0342] Анализ методом проточной цитометрии *ex vivo*. Для оценки размножения и устойчивости CAR Т-клеток *in vivo* периферическую кровь анализировали с помощью проточной цитометрии для определения количества CD3⁺ CAR⁺ клеток / мкл крови с течением времени (таблица 64). В группе дзета-СО экспансия CAR Т-клеток в периферической крови мышей отсутствовала, поскольку количество CD3⁺ CAR⁺ клеток постепенно снижалось до < 1 клетка / мкл после дня 20. Однако группа эpsilon-СО продемонстрировала значительную устойчивость CAR Т-клеток до 62–76 дней, после чего у 3 мышей из 4 количество CAR Т-клеток в крови начало снижаться (таблица 64).

Таблица 64

ДНЕЙ ПОСЛЕ ИНФУЗИИ Т- КЛЕТОК	G1. НЕСУЩАЯ СРЕДА								G2. NTD							
	7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,347	0,175	0,825	0,000	0,114	0,000	0,120
13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,170	0,109	0,373	0,000	0,420	0,086	0,144	0,354
20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,385	0,000	0,274	0,204	0,000	0,126
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,131	0,000	0,000	0,184
34	0,000		0,000	0,000		0,000		0,000	0,000	0,000		0,467		0,261		0,403
48						0,000	0,000	0,000	0,094	0,000			0,000			0,000
62																
76																
90																

Таблица 64 (продолжение)

G3. ДЗЕТА-СО								G4. ЭПСИЛОН-СО							
35,534	17,402	28,549	20,086	22,085	27,287	22,490	19,594	23,241	42,539	36,782	30,664		50,756	46,322	29,184
23,963	4,346	2,759	6,972	3,752	10,656	9,974	11,073	18,441	39,762	27,582	13,122		13,798	21,930	24,618
5,220	1,600	0,806	1,922	0,503	2,251	3,056	2,893	15,903	12,763	7,976			9,984	28,934	7,763
0,450	0,716	0,613	0,405	1,342	0,164	0,131	0,191	21,538	14,389	37,939	47,398		59,796	40,141	45,476
0,124	0,225			0,140				14,514	21,238	12,328	16,891		152,486	20,150	50,277
			0,000				0,000	20,212	52,309	24,140	11,335		19,689	10,574	22,921
								17,946	44,988	21,224	6,286				
								17,039	13,121	32,051	6,270				
								6,683	1,744	16,380	22,514				

[0343] Исследование *in vivo* (дозировка 2). В этом исследовании оценивали устойчивость и противоопухолевую эффективность эpsilon-СО CAR Т-клеток после нескольких повторных стимуляций опухолей клетками Nalm6 МНС I/II ДКО. Изменение массы тела в различные моменты времени от начального значения в начале лечения обобщено в таблице 65. Все CAR-Т-клетки хорошо переносились животными, сохраняющими стабильную массу тела в течение всего исследования. ВЛІ для каждой экспериментальной группы обобщали в таблице 66. В группе, получавшей носитель и NTD, рост опухолей был неконтролируемым и животных подвергли эвтаназии из-за высокой опухолевой нагрузки на день 21. Группы дзета-СО либо после 1 начальной имплантации опухоли на день 0, либо после 4 повторных антигенных стимуляций опухолей Nalm6 МНС I/II ДКО на 21, 28, 35 и день 42 продемонстрировали сопоставимую эффективность: контроль опухоли до дня 20 с последующим рецидивом опухоли до эвтаназии на день 47 из-за высокой опухолевой нагрузки. Напротив, группы эpsilon-СО либо после 1 начальной имплантации опухоли на

день 0, либо после 5 последующих повторных стимуляций опухолей Nalm6 МНС I/II ДКО на дни 21, 28, 35, 42 и 63 сохранили полный клиренс опухоли до завершения исследования на день 84, демонстрируя, что эти клетки значительно улучшали контроль опухоли по сравнению с эталонным контролем дзета-СО.

Таблица 65

ДНЕЙ ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ	НЕСУЩАЯ СРЕДА					NTD					ДЗЕТА-СО				
7	1,9	1,9	2	3,5	1	1,7	1,4	1,3	4,8	-0,5	1,5	-0,9	0,5	0	1
11	3,7	4,8	7,6	8,9	-1,9	8,7	11,8	2,2	8,7	3,9	2	-6,5	7	4,9	2,5
14	8,4	5,2	10,6	9,4	0	5,7	9,1	0	8,7	4,3	0,5	-4,1	8	7,4	15,2
18	7	8,1	12,6	11,4	-3,4	-3,9	4,5	-0,4	8,2	4,8	4,4	-2,3	10,4	10,3	15,7
21											2,9	1,8	9,5	8,4	7,6
24											7,3	0,5	14,9	13,3	18,2
28											7,3	0,5	14,9	13,3	18,2
32											6,8	0	13,4	13,3	15,2
35											6,3	-0,9	14,4	13,3	13,6
41											6,3	4,1	10,9	9,9	19,7
47											7,3	2,3	7	13,8	5,1
55															
67															
77															
84															

Таблица 65 (продолжение)

ЭПСИЛОН-СО					ПОВТОРНАЯ АНТИГЕННАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ОПУХОЛИ ДЗЕТА-СО										ПОВТОРНАЯ АНТИГЕННАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ОПУХОЛИ ЭПСИЛОН-СО									
-7,8	5,2	4,4	2,4	-0,4	2	-2,9	-5,9	-10,2	-1,9	4,3	1	-5,6	2	0,9	-5,5	-0,9	8,3	0,5	-1	1	-6,8	0,4		
-1,3	10,3	9,2	8,2	4	20,7	1	0,5	-7,1	6,1	2,9	12,6	-4,2	1	3,3	-3,7	-1,8	11,5	-3,9	3,8	4,9	5,1	1,7		
0,4	13,4	9,7	9,7	4,8	21,7	2,9	7,9	-5,3	8,5	7,2	17,8	0	7,9	9,4	-5,1	-4,1	16,1	-1,5	6,7	8,3	6,8	0,9		
5,2	19,6	12,6	8,2	4	19,7	6,3	4,4	-5,3	10,8	12,6	20,9	0,5	10,4	11,7	-4,1	-2,3	13,8	0	3,8	9,7	10,7	1,3		
-1,3	17,5	11,7	9,2	2,6	22,2	4,8	4,9	-3,1	9,9	6,8	19,4	-3,7	11,4	9,9	-3,7	-6	11,5	1	4,3	7,8	11,1	0		
-1,3	19,6	15,5	15	5,7	27,3	10,1	9,4	-1,3	14,6	9,7	23,6	2,8	16,3	13,1	-0,9	-1,4	12,4	26,6	1,9	9,2	-2,1	7,7		
-1,3	19,6	15,5	15	5,7	27,3	10,1	9,4	-1,3	14,6	9,7	23,6	2,8	16,3	13,1	-0,9	-1,4	12,4	26,6	1,9	9,2	-2,1	7,7		
-1,3	17	18	14	4	22,2	8,2	5,9	-0,9	11,8	6,3	20,4	-2,8	11,9	12,2	-4,1	-4,1	11,5	21,7	-1,9	8,3	-5,1	4,7		

ЭПСИЛОН-СО					ПОВТОРНАЯ АНТИГЕННАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ОПУХОЛИ ДЗЕТА-СО									ПОВТОРНАЯ АНТИГЕННАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ОПУХОЛИ ЭПСИЛОН- СО								
- 2,2	15,5	17	14,5	4,8	22,7	8,7	6,4	-0,4	11,3	6,3	21,5	-2,8	12,9	12,7	-3,2	-3,7	12,4	20,2	-1,9	9,2	-3	3,8
- 4,3	17	17,5	13	4,4	21,7	10,1	5,4	1,8	9,9	5,8	22,5	-6,9	13,9	13,1	-1,4	-0,5	12,8	23,6	0,5	9,7	-6	9,4
- 5,7	14,9	16	9,7	1,3	12	3,9	-0,9	6,1	4,3	22,5	-8,8	12,4	12,2	0,5	0,9	13,8	23,6	5,8	8,3	-7,7	8,9	
1,3	20,6	18	18,4	2,6										13,6	4,1	3,7	23,9	28,1	6,3	10,7	-2,6	14,9
- 5,7	13,4	11,7	10,6	1,3										10,3	1,4	1,4	14,7	22,7	6,7	8,3	-6	9,8
- 5,7	14,9	16	9,7	1,3										12,2	0,5	0,9	13,8	23,6	5,8	8,3	-7,7	8,9
- 4,3	16	18	11,1	1,8										12,2	1,4	1,4	13,8	23,2	7,2	7,8	-7,3	9,4

Таблица 66

ДНЕЙ ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ	НЕСУЩАЯ СРЕДА					NTD				
7	2,32E+ 06	1,97E+ 06	3,44E+ 06	2,18E+ 06	3,01E+ 06	2,68E+ 06	1,95E+ 06	2,18E+ 06	2,50E+ 06	1,61E+ 06
11	2,78E+ 08	1,58E+ 08	1,20E+ 08	2,25E+ 08	2,66E+ 08	3,42E+ 08	4,07E+ 08	2,05E+ 08	2,56E+ 08	1,46E+ 08
14	2,67E+ 09	1,09E+ 09	2,96E+ 09	2,57E+ 09	2,55E+ 09	1,68E+ 09	2,27E+ 09	7,29E+ 09	1,94E+ 09	1,52E+ 09
18	1,28E+ 10	9,95E+ 09	1,20E+ 10	1,27E+ 10	1,02E+ 10	1,04E+ 10	1,09E+ 10	1,08E+ 10	1,15E+ 10	1,01E+ 10
21	2,04E+ 10	1,61E+ 10	2,74E+ 10	1,79E+ 10	1,68E+ 10	1,08E+ 10	2,08E+ 10	2,17E+ 10	2,14E+ 10	1,38E+ 10
24										
28										
32										
35										
42										
47										
53										
59										
63										
67										
79										
84										

Таблица 66 (продолжение 1)

ДЗЕТА-СО					ЭПСИЛОН-СО				
1,96E+0 6	2,01E+0 6	2,22E+0 6	2,05E+0 6	2,14E+0 6	1,51E+0 6	1,19E+0 6	1,47E+0 6	1,65E+0 6	1,70E+0 6
6,47E+0 5	7,03E+0 5	6,01E+0 5	6,09E+0 5	6,69E+0 5	6,75E+0 5	8,17E+0 5	7,74E+0 5	8,26E+0 5	6,95E+0 5
7,75E+0 5	9,77E+0 5	7,36E+0 5	9,10E+0 5	7,98E+0 5	7,23E+0 5	7,31E+0 5	8,45E+0 5	7,31E+0 5	7,21E+0 5
8,23E+0 5	8,35E+0 5	8,70E+0 5	8,36E+0 5	2,47E+0 6	8,58E+0 5	6,55E+0 5	7,95E+0 5	8,33E+0 5	8,11E+0 5
8,07E+0 5	7,83E+0 5	9,87E+0 5	8,89E+0 5	3,86E+0 6	8,29E+0 5	9,84E+0 5	8,56E+0 5	8,59E+0 5	7,72E+0 5
7,90E+0 5	8,21E+0 5	8,11E+0 5	1,28E+0 6	1,46E+0 7	7,12E+0 5	5,54E+0 5	6,01E+0 5	8,23E+0 5	6,39E+0 5
1,25E+0 6	1,49E+0 6	1,24E+0 6	3,40E+0 6	5,80E+0 6	1,01E+0 6	1,12E+0 6	1,01E+0 6	1,13E+0 6	9,30E+0 5
1,02E+0 6	1,12E+0 6	1,09E+0 6	2,49E+0 7	1,18E+0 6	7,05E+0 5	7,67E+0 5	7,52E+0 5	7,99E+0 5	7,23E+0 5
1,67E+0 6	2,01E+0 6	4,60E+0 6	2,52E+0 8	4,62E+0 6	1,20E+0 6	1,19E+0 6	1,21E+0 6	1,34E+0 6	1,37E+0 6
1,11E+0 8	6,48E+0 7	6,33E+0 9	1,25E+0 8	9,50E+0 7	6,40E+0 5	6,38E+0 5	7,19E+0 5	6,33E+0 5	5,45E+0 5
6,82E+0 8	2,24E+0 8	1,17E+1 0	2,85E+0 8	9,46E+0 8	8,46E+0 5	7,80E+0 5	7,05E+0 5	8,30E+0 5	6,76E+0 5
					6,79E+0 5	7,08E+0 5	6,65E+0 5	7,23E+0 5	7,11E+0 5
					7,49E+0 5	8,27E+0 5	6,95E+0 5	7,23E+0 5	6,88E+0 5
					8,26E+0 5	6,99E+0 5	6,21E+0 5	7,14E+0 5	8,91E+0 5
					6,91E+0 5	7,00E+0 5	6,03E+0 5	6,93E+0 5	7,09E+0 5
					5,39E+0 5	6,46E+0 5	6,12E+0 5	6,20E+0 5	7,07E+0 5
					6,83E+0 5	7,87E+0 5	8,06E+0 5	6,31E+0 5	8,41E+0 5

Таблица 66 (продолжение 2)

ПОВТОРНАЯ АНТИГЕННАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ОПУХОЛИ ДЗЕТА-СО								
1,38E+06	1,09E+06	1,10E+06	1,86E+06	1,26E+06	1,49E+06	1,50E+06	1,36E+06	1,63E+06
6,08E+05	7,81E+05	6,04E+05	6,69E+05	7,97E+05	9,92E+05	7,97E+05	7,15E+05	7,86E+05
7,18E+05	8,09E+05	6,37E+05	7,69E+05	7,53E+05	7,68E+05	8,39E+05	8,81E+05	7,98E+05
8,09E+05	7,84E+05	9,42E+05	7,47E+05	8,69E+05	9,00E+05	8,83E+05	9,36E+05	8,92E+05
6,91E+05	7,46E+05	8,45E+05	7,71E+05	8,40E+05	7,61E+05	7,63E+05	7,45E+05	8,03E+05
1,00E+06	1,04E+06	9,41E+05	1,44E+06	9,49E+05	1,79E+06	2,01E+06	2,04E+06	1,11E+06

ПОВТОРНАЯ АНТИГЕННАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ОПУХОЛИ ДЗЕТА-СО								
6,32E+06	2,89E+06	7,90E+06	2,52E+06	2,96E+06	8,77E+06	1,27E+07	1,27E+07	4,34E+06
1,23E+08	1,36E+07	5,57E+07	2,44E+06	5,30E+06	3,20E+07	1,22E+08	2,34E+08	1,01E+08
1,12E+09	9,57E+07	7,82E+06	2,39E+08	3,82E+07	6,63E+07	4,75E+08	1,32E+09	5,65E+08
4,30E+09	1,57E+09	8,46E+07	1,31E+09	6,78E+08	6,00E+08	1,09E+09	1,10E+10	5,67E+09
6,23E+09	1,06E+10	5,04E+08	3,73E+09	3,04E+09	1,47E+09	1,54E+10	1,79E+09	9,18E+09

Таблица 66 (продолжение 3)

ПОВТОРНАЯ АНТИГЕННАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ОПУХОЛИ ЭПСИЛОН-СО								
1,95E+06	1,56E+06	2,00E+06	1,54E+06	2,87E+06	2,06E+06	1,63E+06	1,93E+06	1,34E+06
8,37E+05	7,06E+05	7,10E+05	7,33E+05	6,03E+05	7,35E+05	5,81E+05	7,59E+05	5,87E+05
7,20E+05	6,55E+05	7,16E+05	7,59E+05	8,19E+05	7,93E+05	9,69E+05	9,20E+05	6,51E+05
7,19E+05	7,11E+05	8,77E+05	7,51E+05	7,80E+05	7,33E+05	7,57E+05	7,52E+05	5,94E+05
7,95E+05	7,29E+05	7,10E+05	8,54E+05	9,77E+05	7,81E+05	6,91E+05	8,38E+05	1,04E+06
7,33E+05	6,59E+05	7,18E+05	8,05E+05	6,44E+05	7,35E+05	7,52E+05	6,92E+05	6,69E+05
8,29E+05	8,01E+05	9,04E+05	1,06E+06	8,40E+05	8,47E+05	8,06E+05	8,78E+05	8,69E+05
8,99E+05	8,54E+05	8,60E+05	9,16E+05	9,00E+05	8,57E+05	9,42E+05	9,29E+05	8,47E+05
1,03E+06	1,03E+06	1,12E+06	1,04E+06	8,66E+05	8,71E+05	8,39E+05	8,81E+05	7,98E+05
7,58E+05	8,69E+05	6,97E+05	7,31E+05	8,19E+05	1,00E+06	8,09E+05	9,39E+05	8,29E+05
8,02E+05	7,53E+05	7,02E+05	6,44E+05	7,85E+05	8,25E+05	9,45E+05	8,31E+05	7,63E+05
7,79E+05	7,69E+05	7,73E+05	8,35E+05	8,13E+05	7,55E+05	7,35E+05	8,00E+05	7,33E+05
9,14E+05	9,78E+05	9,71E+05	1,09E+06	9,81E+05	1,01E+06	9,33E+05	8,67E+05	1,07E+06
9,81E+05	8,62E+05	1,20E+05	9,61E+05	1,16E+06	9,13E+05	1,05E+06	9,41E+05	1,19E+06
6,54E+05	7,18E+05	6,99E+05	7,62E+05	6,65E+05	8,11E+05	7,16E+05	7,55E+05	7,39E+05
8,73E+05	7,11E+05	7,51E+05	7,58E+05	7,78E+05	9,71E+05	8,71E+05	1,02E+05	7,87E+05
8,67E+05	8,75E+05	8,97E+05	8,82E+05	8,41E+05	9,01E+05	7,47E+05	7,57E+05	7,45E+05

[0344] Исследование *in vivo* (дозировка 3). В этом исследовании оценивали противоопухолевую эффективность и РК эpsilon-СО CAR T-клеток по сравнению с Zeta1xx CAR T-клетками. Изменение массы тела в различные моменты времени от начального значения в начале лечения обобщено в таблице 67. Повышение опухолевой нагрузки с течением времени в следующих группах: Носитель, NTD, эpsilon-СО и дзета 1xx при дозах 4e4 и 2e5, приводили к среднему снижению массы тела и/или нежелательным клиническим признакам, после чего всех животных удаляли из исследования. Напротив, все мыши из групп

эпсилон-СО и дзета 1хх при дозе 1еб сохраняли стабильную массу тела в течение периода исследования благодаря значительному контролю опухолевой нагрузки.

[0345] ВЛІ для каждой экспериментальной группы обобщали в таблице 68. В группе, получавшей носитель и NTD, рост опухолей был неконтролируемым и животных подвергли эвтаназии из-за высокой опухолевой нагрузки на день 26. В группах дозой 4е4 от 1 до 2 мышей из 5 в группах эпсилон-СО и 3 мышей из 5 в группе дзета 1хх рост опухолей был неконтролируемым и животных подвергли эвтаназии из-за высокой опухолевой нагрузки. При дозе 2е5 только группа дзета 1хх не показала контроля опухоли у 2 мышей из 5. Напротив, у всех мышей в группе эпсилон-СО при дозе 2е5 рост опухоли контролировался вплоть до конечной точки для этой дозы на день 57, за исключением 1 мыши в группе 7, которая была обнаружена мертвой на день 26. Все конструкты с высокой дозой, эпсилон-СО и дзета 1хх при 1еб, позволяли поддерживать контроль опухоли до 57-го дня, после чего в группах проводили повторную имплантацию опухолей Nalm6 МНС I/II ДКО. До дня 105, когда исследование было прекращено, во всех группах повторной стимуляции, эпсилон-СО и дзета 1хх на 1еб, аналогичным образом поддерживался полный клиренс опухоли.

Таблица 67

ДНЕЙ ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ	G1. НЕСУЩАЯ СРЕДА					G2. NTD					G3. Эпсилон-СО (1еб)					G4. Эпсилон-СО (2е5)				
	5	3,7	5,8	1	8,2	0,5	0,4	1,2	0,5	5,3	4,7	-4,7	-1,6	-2,5	0,4	-2	4,8	-1,2	-1,3	-0,9
7	4,6	0,5	2	7,7	-0,5	0	6,1	-3,2	6,2	6,5	-3	-2	-0,8	2	-1,2	7	-0,4	0,4	0,4	3,4
11	4,1	0,5	-0,5	6,8	0,5	3,1	5,3	-4,6	7,2	5,6	-3	-0,4	0,4	0,4	1,2	8,1	-2,4	0,4	0,4	3,8
15	3,7	-1,4	0	7,2	0	-0,9	3,2	-5,9	7,7	3,4	-4,3	-1,6	-0,4	0	-1,2	8,6	-2	1,3	1,3	6,4
19	8,3	0,5	-0,5	7,7	1,9	0	5,7	2,3	7,2	0,4	-2,6	1,2	4,7	0	-1,6	8,1	1,2	-0,4	2,6	2,1
22	5,5	-2,4	0,5	6,3	0,5	-2,2	2,4	0,5	4,8	-0,9	-1,7	2	5,9	0,4	-0,4	8,6	0	0	4,8	2,1
26	-7,8	-	-7,4	1,4	-3,8	-	-2,8	-7,8	-1,9	-	-0,4	3,6	6,4	-0,4	-1,6	12,4	0,4	2,2	9,3	7,7
29		13,5				10,3					11,2									
29											2,1	11,3	8,9	0,4	2,8	15,1	-0,4	4	7	7,2
33											6,8	15,4	14,4	2,8	5,7	17,7	2,9	11	8,4	9,8
36											8,5	13,8	13,6	7,2	6,1	28	6,9	11	11	13,6
43											7,3	10,1	13,6	5,6	4,9	29,6	2,4	7	9,3	3,8
47											3	11,7	16,5	9,6	7,7	26,9	2,9	1,8	4,4	6,4
50											3,8	9,3	15,3	12,8	4,5	25,8	2,4	4,4	4,4	6,4
54											11,5	15	22,9	20,4	8,1	28	7,8	10,6	9,7	10,2
57											8,1	14,2	20,3	22,8	8,5	32,3	10,6	7,5	11,5	11,9
67											9	17,4	19,1	14,8	3,3					
81											5,6	22,7	14,4	16	6,5					
84											9,4	11,3	17,8	21,6	10,6					
88											14,5	19	13,6	18,8	14,2					

ДНЕЙ ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ	G1. НЕСУЩАЯ СРЕДА					G2. NTD					G3. Эпсилон-СО (1e6)					G4. Эпсилон-СО (2e5)					
	95												6,4	16,2	12,7	20,4	5,7				
99												7,7	13	11	24,4	4,9					
104												11,1	25,5	20,8	25,6	9,3					

Таблица 67 (продолжение 1)

G5. ЭПСИЛОН-СО (4e4)					G6. ЭПСИЛОН-СО (Δ181-185) (1e6)					G7. ЭПСИЛОН-СО (Δ181-185) (2e5)					G8. ЭПСИЛОН-СО (Δ181-185) (4e4)				
2,7	0,4	-0,5	-1,6	0	-2,5	-1,2	0,8	0,5	0,4	-3,3	0,5	4,6	0,5	5,7	-2,5	-1,3	-0,4	-2,2	-1,9
2,3	0,4	-1,4	0	1,2	-3	-2,8	1,2	1,4	-3,1	-4,1	0	5,1	-1,9	4,7	-3	-0,4	0,4	-2,7	-1
2,7	0,8	-0,5	0,8	2,4	5,5	-3,2	5,1	1,8	-3,1	-10,3	-1,1	3,2	-2,4	2,1	-6,4	-1,3	1,1	-2,7	2,4
0,5	-2,1	-0,5	1,6	0	4,7	-2,4	2,7	3,6	-2	-9,5	0	3,7	0	4,2	-9,7	-3,1	-7,2	-4,4	1,4
1,8	4,6	0	2	-1,2	4,7	-4	3,5	5	1,6	-7	5,8	1,9	1,9	4,7	-5,9	2,2	2,6	4	5,3
3,2	7,1	1,9	4,4	0	5,5	-3,6	2,7	6,3	2	-6,2	6,3	1,9	3,3	5,7	-5,5	1,3	1,5	4,9	5,7
6,4	6,7	3,3	2	0	8,5	0,8	7,8	7,2	5,9	-0,4	8,4	11,1		10,9	-1,7	5,3	2,6	4,4	9,1
12,8	0,4	6,2	-0,8	3,6	8,5	0,8	8,2	8,1	4,7	2,9	9,5	5,6		9,9	1,7	6,2	4,5	6,7	11,5
20,1	-7,9	10,4	-4,4	8	12,3	5,2	7,8	7,7	4,7	0	11,1	6,5		13,5	6,8	10,1	9,4	4,9	4,3
14,6	-24,3	12,3	-23,7	14	20,3	8,4	14,4	12,6	7,8	6,6		22,1	9,7	20,3	9,7	17,6	8,3	14,2	-6,7
18,3		11,8		8,4	9,7	10,8	17,1	15,8	9,4	-1,2		22,1	7,9	21,9	5,5	18,9	9,4	4,4	-24,4
15,5		19		10,8	9,7	2,4	12,8	10,4	3,5	3,3		24,7	10,2	26,6	4,2	14,1	6,8	8,4	
11		16,6		11,2	10,6	5,6	15,6	13,1	3,5	2,9		22,1	10,2	30,7	5,9	14,1	3,8	11,6	
13,2		16,6		9,6	20,3	6	25,7	17,1	7,5	-0,8		22,6	14,4	29,2	6,4	24,7	-6,4	18,7	
21		19,9		13,6	18,2	8	24,1	19,4	11,4	3,7		25,3	15,7	37,5	8,9	19,4	8,3	14,2	
					12,3	5,6	30,7	23	11,4										
					14,4	10,4	23,3	17,1	7,5										
					15,7	12,4	26,1	21,2	6,7										
					24,2	15,3	25,3	27	12,9										
					15,3	9,2	24,5	19,4	9										
					14	7,6	27,2	19,4	12,5										
					20,3	16,5	24,1	14,4	12,9										

Таблица 67 (продолжение 2)

G9. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (1e6)					G10. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (2e5)					G11. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (4e4)					G12. ДЗЕТА 1xx (1e6)				
-1,8	-0,9	2,7	-0,5	-0,4	-0,9	7,6	0	-1	1,2	-3,3	-1	0,9	2,1	0	0	1,4	0,9	1	-0,5
-7,1	-0,5	3,6	-0,5	0,4	0,9	7,2	1,8	1	0	-4,1	-1,6	0,4	2,6	1	1,4	1,9	0,9	0,5	-1,4
-5,4	-1,9	3,6	-1	-1,7	-0,4	0,4	-0,4	2,9	4,3	-2,1	4,1	3,5	3,4	1	1,9	1,4	4,8	0,5	3,3
-5,4	2,3	3,2	1	-0,9	0,4	1,3	0	4,4	5,5	-2,9	5,2	4,4	3,8	4,2	2,8	1,9	3,9	3,1	4,7
-8,9	2,3	0	-0,5	-0,4	-0,9	4,5	3,6	2,9	4,9	-1,2	4,1	1,3	2,6	5,7	4,2	1,4	4,4	6,2	1,9
-7,6	3,7	1,4	1	1,3	-1,3	4,9	2,2	4,4	6,1	-1,2	4,7	1,8	1,7	6,3	4,2	2,3	0,4	8,2	3,3
-5,4	6,5	5	9,6	5,1	1,7	1,3	9,4	9,3	8,6	2,5	6,7	4,4	4,3	9,4	4,2	3,7	4,4	9,3	8,5
-4	10,2	5,4	14,1	6,4	5,1	4,9	13,8	7,8	13,5	0,8	3,6	7,1	1,7		6,1	1,9	8,3	13,4	7,5
-1,8	16,3	9,5	22,7	14,5	8,1	9,9	17,4	10,8	13,5	-2,9	7,8	11,9	6		8,5	4,2	9,6	13,9	11,7
1,3	22,3	11,3	16,2	19,1	9,4	12,6	22,3	11,3	1,9	-	19,2	11,5	13,2		13,7	15,9	17	22,7	18,3

G9. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (1e6)					G10. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (2e5)					G11. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (4e4)				G12. ДЗЕТА 1xx (1e6)					
										25,5									
8,9	22,3	21,6	18,7	19,1	6,4	11,2	17,4	6,4	25,2		20,7	15	8,1		17,9	20,6	17,9	16,5	21,1
11,2	14	14,9	23,7	14	10,3	12,1	20,5	7,4	28,8		23,3	11,1	9,8		20,3	15,9	18,8	14,9	23,5
-0,9	19,5	14,9	22,7	12,3	10,7	9,4	19,6	7,8	25,8		25,4	12,8	9		17,9	16,8	16,6	15,5	23
2,2	25,6	16,2	22,7	21,3	11,5	10,3	21,4	8,8	27		17,1	12,4	2,6		17	17,3	19,2	19,1	25,8
7,6	26,5	19,8	21,7	21,3	10,7	11,2	20,5	13,2	30,1		20,2	14,6	6,4		22,2	17,8	21	23,2	22,1
0,9	20,9	17,1	29,3	18,3											19,8	20,6	24,5	19,6	22,1
3,1	25,1	23	19,7	18,3											20,8	25,2	24,5	19,1	24,4
6,3	23,7	28,4	23,7	15,3											21,7	31,8	23,6	22,7	23,5
8,5	25,1	19,8	24,7	18,7											24,1	33,6	30,6	28,4	21,6
4,9	27	18	25,8	24,7											25	24,3	34,9	23,2	21,1
0,9	24,2	18,5	24,2	20,9											24,1	24,3	33,2	24,2	23
11,6	30,7	17,1	31,8	20,9											28,3	25,2	38,9	27,3	27,7

Таблица 67 (продолжение 3)

G13. ДЗЕТА 1xx (2e5)					G14. ДЗЕТА 1xx (4e4)					НОСИТЕЛЬ G15. ДЛЯ ПОВТОРНОЙ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ			
-0,9	-1,6	8,4	2,4	0,5	6,1	2,4	-3,7	5,9	1,3				
-2,8	-3,6	8,9	1,9	0	6,5	3,3	-2,8	5,4	1,3				
-0,5	-3,6	8,4	5,2	3,2	7,9	1,4	-0,5	2,5	3,1				
0,9	-2,1	8,9	6,7	4,5	8,9	1,9	0,9	3	4,5				
2,3	0,5	12,3	6,7	5,9	12,6	4,7	3,7	3	4,5				
1,9	0	11,8	6,2	7,3	15	5,2	5,1	3,4	7,1				
7,9	9,3	11,3	10,5	2,7	17,3	5,7	1,9	4,4	7,1				
6,9	9,8	13,3	12,9	3,6	19,2	-3,3	-0,9	3,9	3,6				
6,9	11,4	10,3	16,2	1,8	20,6	-14,2	-19,2	10,3	3,6				
10,2	8,3	15,3	9	2,7	25,2			18,2					
4,6	-9,8	11,3	-17,1	1,8	16,8			17,2					
6,5	-25,9	9,9		6,4	19,6			16,7					
4,6		12,8		7,3	16,8			14,3					
12,5		17,2		4,5	21,5			17,2					
17,6		12,8		5	22			16,3					
										27,6	19,9	23,7	6,8
										30	24,4	28,4	8,9
										25,2	27,9	22,3	11
										10,5	10,9	11,6	-5,1

Таблица 68

ДНЕЙ ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ	G1. НЕСУЩАЯ СРЕДА					G2. NTD				
	5	5,06E+06	3,42E+06	3,29E+06	2,42E+06	3,84E+06	2,65E+06	1,66E+06	2,54E+06	1,95E+06
7	2,15E+07	1,82E+07	1,17E+07	1,46E+07	1,25E+07	2,31E+07	9,88E+07	1,73E+07	1,55E+07	1,40E+07
11	8,43E+08	9,38E+08	8,31E+08	8,70E+08	1,05E+09	1,10E+09	5,48E+08	8,93E+08	6,36E+08	8,21E+08
15	4,45E+09	4,93E+09	7,04E+09	8,68E+09	6,46E+09	4,01E+09	5,02E+09	6,74E+09	5,85E+09	3,96E+09
19	1,85E+10	1,96E+10	1,07E+10	1,60E+10	1,79E+10	1,36E+10	1,46E+10	1,50E+10	1,28E+10	1,53E+10
22	2,53E+10	3,08E+10	2,97E+10	3,43E+10	3,83E+10	3,11E+10	3,07E+10	3,16E+10	3,11E+10	3,72E+10
26		3,69E+10	5,30E+10	4,98E+10	4,92E+10	4,31E+10	4,71E+10	4,74E+10	3,82E+10	
29										
33										
36										
40										
43										
47										
50										
54										
57										
67										
76										
81										
84										
88										
92										
96										
99										
105										

Таблица 68 (продолжение 1)

G3. Эпсилон-CO (1e6)					G4. Эпсилон-CO (2e5)				
1,63E+06	1,79E+06	1,81E+06	1,81E+06	2,56E+06	2,67E+06	1,72E+06	2,50E+06	3,15E+06	1,94E+06
1,23E+06	1,43E+06	1,04E+06	1,21E+06	1,46E+06	6,35E+06	7,49E+06	6,52E+06	1,39E+07	5,45E+06
1,07E+06	1,81E+06	1,10E+06	1,27E+06	1,38E+06	2,87E+06	4,05E+06	5,89E+06	1,68E+07	7,22E+06
1,41E+06	1,51E+06	1,24E+06	1,33E+06	1,23E+06	1,83E+06	3,99E+06	5,97E+06	1,46E+07	4,02E+06
9,60E+05	8,80E+05	9,09E+05	1,17E+06	1,04E+06	1,02E+06	1,49E+06	1,09E+06	1,13E+06	1,07E+06
8,93E+05	9,23E+05	7,23E+05	7,74E+05	1,70E+05	9,40E+05	1,21E+06	1,09E+06	1,14E+06	1,32E+06
8,80E+05	9,37E+05	9,53E+05	9,57E+05	9,83E+05	1,25E+06	1,31E+06	8,89E+05	1,10E+06	1,18E+06

G3. Эпсилон-СО (1e6)					G4. Эпсилон-СО (2e5)				
5	5	5	5	5	6	6	5	6	6
1,19E+0 6	1,20E+0 6	1,07E+0 6	1,40E+0 6	1,19E+0 6	1,24E+0 6	1,35E+0 6	9,17E+0 5	1,13E+0 6	1,15E+0 6
8,76E+0 5	9,83E+0 5	8,77E+0 5	8,80E+0 5	8,29E+0 5	1,28E+0 6	1,30E+0 6	1,33E+0 6	1,04E+0 6	1,33E+0 6
8,07E+0 5	8,70E+0 5	6,07E+0 5	7,18E+0 5	7,65E+0 5	1,13E+0 6	1,21E+0 6	9,41E+0 5	1,14E+0 6	1,21E+0 6
7,86E+0 5	8,55E+0 5	1,10E+0 5	8,35E+0 5	9,46E+0 5	1,17E+0 6	1,15E+0 6	1,02E+0 6	1,05E+0 6	1,24E+0 6
1,55E+0 6	1,34E+0 6	1,25E+0 6	1,45E+0 6	1,14E+0 6	1,24E+0 6	1,31E+0 6	1,09E+0 6	1,28E+0 6	1,30E+0 6
1,18E+0 6	1,42E+0 6	1,17E+0 6	1,13E+0 6	1,03E+0 6	1,11E+0 6	1,17E+0 6	1,27E+0 6	9,18E+0 5	9,65E+0 5
8,62E+0 5	1,18E+0 6	8,75E+0 5	1,10E+0 6	1,01E+0 6	1,30E+0 6	1,29E+0 6	8,71E+0 5	1,04E+0 6	8,90E+0 5
8,61E+0 5	1,02E+0 6	1,02E+0 5	9,86E+0 5	9,36E+0 5	1,22E+0 6	1,04E+0 6	8,71E+0 5	8,82E+0 5	8,27E+0 5
8,79E+0 5	9,78E+0 5	8,27E+0 5	1,16E+0 6	9,38E+0 5	1,08E+0 6	1,36E+0 6	1,02E+0 6	1,12E+0 6	1,05E+0 6
5,02E+0 5	5,27E+0 5	6,89E+0 5	5,51E+0 5	5,35E+0 5					
8,62E+0 5	8,14E+0 5	9,70E+0 5	8,40E+0 5	6,35E+0 5					
9,43E+0 5	1,24E+0 6	1,03E+0 5	9,15E+0 5	8,18E+0 5					
5,07E+0 5	6,80E+0 5	5,79E+0 5	5,62E+0 5	5,67E+0 5					
6,75E+0 5	7,56E+0 5	6,41E+0 5	7,63E+0 5	7,12E+0 5					
8,91E+0 5	8,19E+0 5	8,84E+0 5	8,21E+0 5	8,16E+0 5					
7,47E+0 5	9,10E+0 5	8,79E+0 5	8,10E+0 5	7,31E+0 5					
7,01E+0 5	6,47E+0 5	7,91E+0 5	6,81E+0 5	6,00E+0 5					
5,74E+0 5	5,92E+0 5	5,66E+0 5	6,06E+0 5	6,63E+0 5					

Таблица 68 (продолжение 2)

G5. ЭПСИЛОН-СО (4e4)					G6. ЭПСИЛОН-СО (Δ181–185) (1e6)				
1,84E+0 6	1,50E+0 6	7,13E+0 5	1,65E+0 6	1,70E+0 6	1,96E+0 6	2,06E+0 6	2,09E+0 6	3,88E+0 6	2,23E+0 6
8,92E+0 6	7,41E+0 6	1,51E+0 7	9,48E+0 6	7,71E+0 6	1,94E+0 6	1,36E+0 6	1,73E+0 6	1,96E+0 6	2,10E+0 6
8,68E+0 7	7,78E+0 7	2,46E+0 8	1,31E+0 8	6,56E+0 7	1,16E+0 6	1,13E+0 6	1,37E+0 6	1,46E+0 6	1,15E+0 6
5,40E+0 8	8,16E+0 8	7,58E+0 8	8,96E+0 8	2,38E+0 8	1,47E+0 6	1,46E+0 6	1,38E+0 6	1,57E+0 6	1,44E+0 6
3,23E+0 7	2,74E+0 9	3,70E+0 8	1,00E+0 9	1,50E+0 9	9,24E+0 5	1,08E+0 6	1,01E+0 6	9,73E+0 5	1,44E+0 5
2,41E+0 8	3,50E+0 9	5,98E+0 7	4,53E+0 9	5,50E+0 7	1,06E+0 6	1,13E+0 6	1,04E+0 6	1,05E+0 6	1,04E+0 6
1,10E+0 8	9,13E+0 9	1,94E+0 8	1,13E+1 0	1,28E+0 8	1,04E+0 6	1,05E+0 6	1,03E+0 6	1,19E+0 6	1,05E+0 6
1,61E+0 8	1,39E+1 0	3,12E+0 8	1,55E+1 0	3,02E+0 8	1,06E+0 6	1,10E+0 6	1,09E+0 6	1,05E+0 6	8,45E+0 5
5,95E+0	3,80E+1	1,09E+0	5,72E+1	9,93E+0	1,01E+0	9,77E+0	8,65E+0	9,75E+0	1,37E+0

G5. ЭПСИЛОН-СО (4e4)				G6. ЭПСИЛОН-СО (Δ181–185) (1e6)					
8	0	9	0	8	6	5	5	6	6
1,26E+09	9,87E+10	2,90E+09	7,34E+10	2,12E+09	1,03E+06	9,62E+05	1,21E+06	1,03E+06	1,47E+06
1,14E+06		9,54E+05		1,15E+06	1,43E+06	1,06E+06	9,10E+05	1,06E+06	1,24E+06
1,27E+06		1,11E+06		1,21E+06	9,30E+05	1,17E+06	1,29E+06	9,96E+05	1,07E+06
1,18E+06		9,67E+05		9,68E+06	9,68E+05	9,41E+05	8,96E+05	9,98E+05	9,07E+05
1,01E+06		8,99E+05		1,24E+06	9,40E+05	9,64E+05	1,03E+06	1,10E+06	1,07E+06
9,60E+05		9,51E+05		8,81E+05	9,62E+05	9,29E+05	9,39E+05	9,78E+05	1,07E+06
9,48E+05		9,43E+05		1,22E+06	1,01E+06	9,75E+06	1,06E+06	1,11E+06	8,54E+05
					5,58E+05	5,41E+05	5,48E+05	7,06E+05	6,81E+05
					8,97E+05	1,02E+06	1,05E+06	1,02E+06	1,10E+06
					7,28E+05	8,35E+05	7,25E+05	8,55E+05	7,02E+05
					8,56E+05	9,60E+05	8,88E+05	9,88E+05	7,85E+05
					7,90E+05	7,94E+05	7,37E+05	1,02E+06	8,50E+05
					1,01E+06	9,93E+05	8,36E+06	1,09E+06	1,02E+06
					9,18E+05	9,64E+05	8,16E+06	8,42E+06	7,88E+05
					9,58E+05	1,13E+06	1,01E+06	1,20E+06	1,05E+06
					1,08E+06	1,10E+06	9,71E+05	1,12E+06	9,68E+06

Таблица 68 (продолжение 3)

G7. ЭПСИЛОН-СО (Δ181–185) (2e5)					G8. ЭПСИЛОН-СО (Δ181–185) (4e4)				
2,49E+06	3,89E+06	3,21E+06	2,92E+06	3,97E+06	2,43E+06	2,14E+06	2,31E+06	1,92E+06	2,28E+06
8,41E+06	1,57E+07	1,27E+07	1,16E+07	1,45E+07	1,48E+07	2,05E+07	1,52E+07	1,51E+07	1,64E+07
4,44E+06	3,81E+06	3,25E+06	3,90E+06	8,11E+06	3,48E+08	1,35E+08	1,26E+08	1,93E+08	9,64E+07
5,34E+06	5,24E+06	6,20E+06	6,32E+06	9,64E+06	8,50E+08	5,15E+08	3,35E+08	4,61E+08	2,90E+08
1,10E+06	1,09E+06	9,63E+06	1,29E+06	8,28E+05	2,54E+09	1,44E+09	1,29E+09	3,39E+09	1,28E+09
1,09E+06	1,19E+06	1,20E+06	1,29E+06	1,29E+06	2,19E+09	1,16E+09	3,40E+08	1,50E+09	2,48E+09
1,01E+06		9,24E+05	1,06E+06	1,09E+06	3,92E+07	4,38E+09	4,82E+07	7,16E+08	1,94E+07
8,91E+05		1,10E+06	1,05E+06	9,98E+05		5,07E+07	1,35E+07	1,23E+08	1,37E+10
1,04E+06		9,58E+05	1,10E+06	1,07E+06	2,13E+07	4,72E+07	2,24E+07	4,20E+08	3,45E+10
9,27E+05		9,50E+05	1,06E+06	8,82E+05	1,59E+05	3,01E+07	2,30E+07	3,93E+08	3,10E+10

G7. ЭПСИЛОН-СО (Δ181–185) (2e5)					G8. ЭПСИЛОН-СО (Δ181–185) (4e4)				
8,92E+0 5		8,15E+0 5	1,07E+0 6	9,90E+0 5	1,87E+0 7	1,51E+0 7	2,29E+0 7	2,77E+0 8	3,44E+1 0
1,17E+0 6		1,15E+0 6	1,19E+0 6	1,10E+0 6	4,36E+0 7	2,92E+0 7	3,73E+0 7	5,04E+0 8	7,55E+1 0
8,59E+0 5		8,56E+0 5	9,95E+0 5	9,73E+0 5	9,75E+0 5	2,83E+0 6	1,06E+0 6	9,37E+0 5	
8,59E+0 5		8,56E+0 5	9,95E+0 5	9,73E+0 5	9,79E+0 5	1,56E+0 6	9,66E+0 5	9,22E+0 5	
1,06E+0 6		1,09E+0 6	1,02E+0 6	1,12E+0 6	1,15E+0 6	4,66E+0 6	9,79E+0 5	1,09E+0 6	
9,24E+0 6		9,54E+0 5	9,85E+0 5	1,08E+0 6	1,01E+0 6	1,27E+0 7	1,29E+0 6	9,40E+0 5	

Таблица 68 (продолжение 4)

G9. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (1e6)					G10. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (2e5)				
3,05E+0 6	4,45E+0 6	2,32E+0 6	2,89E+0 6	3,33E+0 6	2,11E+0 6	2,23E+0 6	2,96E+0 6	2,84E+0 6	3,50E+0 6
1,73E+0 6	2,00E+0 6	2,09E+0 6	1,11E+0 6	1,80E+0 6	1,00E+0 7	1,59E+0 7	1,70E+0 7	1,55E+0 7	1,91E+0 7
1,13E+0 6	1,44E+0 6	1,02E+0 6	1,44E+0 6	1,18E+0 6	2,92E+0 6	7,70E+0 6	1,35E+0 7	9,31E+0 6	1,28E+0 7
1,48E+0 6	1,28E+0 6	1,18E+0 6	1,45E+0 6	1,61E+0 6	2,70E+0 6	9,03E+0 6	2,23E+0 7	1,80E+0 7	2,60E+0 7
1,25E+0 6	1,21E+0 6	9,96E+0 5	9,49E+0 5	1,20E+0 6	1,11E+0 6	1,56E+0 6	3,26E+0 7	3,51E+0 6	2,15E+0 6
1,13E+0 6	1,14E+0 6	1,00E+0 6	1,09E+0 6	1,05E+0 6	9,22E+0 5	1,02E+0 6	2,52E+0 6	1,04E+0 6	1,11E+0 6
1,11E+0 6	1,05E+0 6	1,03E+0 6	9,12E+0 5	1,05E+0 6	9,09E+0 5	1,10E+0 6	1,18E+0 6	1,04E+0 6	1,03E+0 6
1,08E+0 6	9,12E+0 5	9,06E+0 5	9,64E+0 5	9,38E+0 5	1,18E+0 6	1,15E+0 6	1,01E+0 6	1,04E+0 6	1,12E+0 6
1,31E+0 6	1,36E+0 6	1,12E+0 6	1,15E+0 6	1,40E+0 6	1,21E+0 6	1,24E+0 6	1,12E+0 6	1,28E+0 6	1,11E+0 6
1,27E+0 6	1,10E+0 6	1,05E+0 6	1,11E+0 6	1,09E+0 6	7,80E+0 5	1,05E+0 6	1,15E+0 6	9,95E+0 5	1,27E+0 6
6,04E+0 6	5,69E+0 5	6,25E+0 5	6,51E+0 5	6,21E+0 5	7,45E+0 5	6,58E+0 5	6,15E+0 5	7,80E+0 5	8,52E+0 5
1,04E+0 6	1,06E+0 6	1,02E+0 6	1,20E+0 6	1,29E+0 6	1,20E+0 6	1,31E+0 6	1,11E+0 6	1,00E+0 6	9,90E+0 6
1,08E+0 6	1,06E+0 6	1,08E+0 6	1,12E+0 6	9,11E+0 5	1,02E+0 6	1,26E+0 6	9,20E+0 5	1,03E+0 6	1,07E+0 6
1,00E+0 6	9,91E+0 5	1,00E+0 6	1,02E+0 6	1,04E+0 6	9,10E+0 5	1,11E+0 6	8,31E+0 5	1,11E+0 6	1,02E+0 6
8,98E+0 5	1,12E+0 6	1,10E+0 6	1,15E+0 6	1,04E+0 6	9,41E+0 5	1,07E+0 6	7,66E+0 5	9,14E+0 5	8,88E+0 5

G9. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (1e6)					G10. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (2e5)				
1,03E+0 6	1,01E+0 6	1,27E+0 6	9,90E+0 5	1,05E+0 6	1,10E+0 6	1,33E+0 6	9,35E+0 5	1,16E+0 6	1,02E+0 6
4,98E+0 5	4,73E+0 5	4,89E+0 5	4,73E+0 5	5,26E+0 5					
8,61E+0 5	1,24E+0 6	7,65E+0 5	9,46E+0 5	1,04E+0 6					
8,54E+0 5	1,11E+0 6	9,42E+0 5	7,41E+0 5	1,03E+0 6					
1,10E+0 6	9,41E+0 5	8,73E+0 5	9,10E+0 5	9,83E+0 5					
8,32E+0 5	6,89E+0 5	8,78E+0 5	8,62E+0 5	8,13E+0 5					
9,05E+0 5	1,10E+0 6	6,72E+0 5	1,05E+0 6	9,59E+0 5					
6,20E+0 5	8,26E+0 5	5,50E+0 5	8,37E+0 5	1,06E+0 6					
1,15E+0 6	7,29E+0 5	8,90E+0 5	1,02E+0 6	9,10E+0 5					
9,11E+0 5	7,75E+0 5	9,10E+0 5	9,21E+0 5	9,06E+0 5					

Таблица 68 (продолжение 5)

G11. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (4e4)					G12. ДЗЕТА 1xx (1e6)				
3,42E+0 6	3,48E+0 6	2,87E+0 6	2,64E+0 6	4,54E+0 6	4,92E+0 6	5,44E+0 6	2,29E+0 6	5,23E+0 6	5,31E+0 6
3,15E+0 7	3,23E+0 7	2,39E+0 7	2,99E+0 7	5,13E+0 7	2,86E+0 6	3,50E+0 6	2,35E+0 6	2,97E+0 6	3,80E+0 6
2,90E+0 8	2,77E+0 8	3,31E+0 8	3,05E+0 8	6,05E+0 8	1,23E+0 6	1,30E+0 6	1,54E+0 6	1,21E+0 6	1,35E+0 6
9,78E+0 8	1,09E+0 9	1,03E+0 9	9,80E+0 8	1,93E+0 9	1,32E+0 6	1,39E+0 6	1,23E+0 6	1,32E+0 6	1,10E+0 6
6,40E+0 9	6,18E+0 9	7,47E+0 9	6,27E+0 9	8,15E+0 9	1,61E+0 6	1,26E+0 6	1,19E+0 6	1,34E+0 6	8,34E+0 6
6,53E+0 9	3,96E+0 9	3,49E+0 9	2,12E+0 9	1,16E+1 0	1,01E+0 6	8,33E+0 5	8,40E+0 5	9,04E+0 5	3,67E+0 6
1,72E+1 0	4,60E+0 8	1,73E+0 8	2,71E+0 8	2,61E+1 0	1,13E+0 6	1,10E+0 6	1,02E+0 6	1,06E+0 6	1,09E+0 6
2,34E+1 0	2,09E+0 8	1,99E+0 7	9,50E+0 6		1,04E+0 6	1,09E+0 6	9,97E+0 5	1,03E+0 6	9,89E+0 5
5,72E+1 0	8,33E+0 8	4,98E+0 7	2,40E+0 7		1,26E+0 6	1,24E+0 6	1,12E+0 6	1,20E+0 6	1,18E+0 6
	9,93E+0 6	1,08E+0 6	1,01E+0 6		5,99E+0 5	8,60E+0 5	7,70E+0 5	8,21E+0 5	7,86E+0 5
	3,09E+0 7	1,32E+0 6	1,02E+0 6		1,15E+0 6	9,51E+0 5	1,05E+0 6	1,21E+0 6	8,73E+0 5
	2,83E+0 7	1,33E+0 6	1,10E+0 6		9,68E+0 5	9,71E+0 5	9,28E+0 5	9,00E+0 5	9,03E+0 5
	2,35E+0 7	7,79E+0 5	6,62E+0 5		1,02E+0 6	1,05E+0 6	1,26E+0 6	1,09E+0 6	1,18E+0 6
	4,55E+0 7	1,31E+0 6	9,20E+0 5		1,13E+0 6	1,04E+0 6	1,02E+0 6	1,06E+0 6	1,05E+0 6
	9,92E+0 7	1,10E+0 6	7,86E+0 5		1,09E+0 6	1,10E+0 6	9,14E+0 5	1,08E+0 6	9,18E+0 5
	1,13E+0 7	1,01E+0 6	1,02E+0 6		1,02E+0 6	1,04E+0 6	1,16E+0 6	1,01E+0 6	1,12E+0 6
					6,97E+0 5	6,22E+0 5	6,66E+0 5	6,19E+0 5	7,17E+0 5

G11. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (4e4)					G12. ДЗЕТА 1xx (1e6)				
					1,17E+0 6	9,10E+0 5	7,50E+0 5	9,02E+0 5	9,51E+0 5
					1,20E+0 6	9,35E+0 5	9,50E+0 5	1,23E+0 6	9,41E+0 5
					7,15E+0 5	8,87E+0 5	1,13E+0 6	9,09E+0 5	9,14E+0 5
					8,33E+0 5	9,84E+0 5	9,05E+0 5	8,47E+0 5	8,34E+0 5
					1,14E+0 6	1,04E+0 6	8,26E+0 5	9,30E+0 5	9,43E+0 5
					1,14E+0 6	1,10E+0 6	1,11E+0 6	8,49E+0 5	1,09E+0 6
					9,49E+0 5	8,83E+0 5	8,07E+0 5	7,12E+0 5	7,81E+0 5
					8,54E+0 5	7,50E+0 5	7,92E+0 5	1,03E+0 6	7,04E+0 5

Таблица 68 (продолжение 6)

G13. ДЗЕТА 1xx (2e5)					G14. ДЗЕТА 1xx (4e4)					G15. НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ПОВТОРНОЙ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ			
5,16E +06	4,12E +06	4,29E +06	3,82E +06	6,70E +06	3,50E +06	4,83E +06	7,91E +06	3,89E +06	5,66E +06				
7,07E +07	3,38E +07	2,49E +07	3,05E +07	4,36E +07	2,70E +07	2,62E +07	4,92E +07	3,02E +07	2,56E +07				
5,18E +07	1,02E +07	1,67E +07	1,31E +07	1,61E +07	2,69E +08	2,95E +08	7,03E +08	2,66E +08	4,95E +08				
3,43E +07	1,07E +07	2,41E +07	1,19E +07	1,64E +07	1,12E +09	6,51E +08	2,09E +09	5,76E +08	1,32E +09				
1,47E +08	5,87E +07	7,69E +07	3,99E +07	2,47E +07	1,18E +09	1,46E +09	4,70E +09	1,37E +09	3,08E +09				
3,12E +08	1,65E +08	2,87E +08	7,41E +07	2,73E +07	8,22E +08	2,93E +09	7,11E +09	3,40E +08	2,94E +09				
2,27E +09	1,65E +09	1,41E +09	5,62E +08	1,85E +07	1,70E +09	8,90E +09	1,37E +10	2,14E +08	6,80E +09				
1,01E +08	4,24E +09	8,58E +09	2,81E +09	9,40E +09	2,32E +09	2,32E +10	2,03E +10	4,45E +08	1,19E +10				
1,62E +10	9,97E +09	2,14E +10	8,42E +09	3,01E +08	2,09E +09	2,01E +10	3,62E +10	1,49E +09	4,40E +10				
1,08E +09	3,22E +10	7,31E +08	2,47E +10	7,26E +08	9,23E +06			1,31E +08					
4,69E +08	3,13E +10	9,25E +08	4,70E +10	1,13E +09	3,05E +06			4,50E +07					
1,47E +09	7,26E +10	1,98E +09	4,87E +10	1,40E +09	1,66E +06			2,59E +07					
1,03E +09	6,28E +10	1,20E +09		5,39E +07	6,69E +05			3,41E +06					
3,12E +06		3,79E +06		3,22E +06	1,08E +06			3,66E +06					
5,93E +06		1,32E +07		1,77E +08	1,09E +06			4,72E +06					
5,86E +06		3,73E +07		9,73E +08	1,04E +06			8,88E +06					

G13. ДЗЕТА 1xx (2e5)					G14. ДЗЕТА 1xx (4e4)					G15. НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ПОВТОРНОЙ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ			
										1,21E+06	1,22E+06	1,15E+06	1,24E+06
										1,69E+06	2,21E+06	1,74E+06	1,92E+06
										6,91E+07	1,23E+08	4,24E+07	8,53E+07
										3,01E+09	3,20E+09	2,37E+09	2,22E+09
										4,81E+09	5,50E+09	4,69E+09	4,94E+09

[0346] Анализ кцПЦР *ex vivo*. Для оценки экспансии и устойчивости CAR Т-клеток *in vivo* периферическую кровь анализировали с помощью кцПЦР на число копий CAR на мкг геномной ДНК (гДНК) (таблица 69). Дзета 1xx CAR Т-клетки были обнаружены в периферической крови мышей, но показали ограниченную экспансию по сравнению с эpsilon-СО. Все группы эpsilon-СО аналогичным образом продемонстрировали устойчивую экспансию и устойчивость CAR Т-клеток в периферической крови мышей, особенно в экспериментальных группах 2e5 и 4e4.

Таблица 69

ДНЕЙ ПОСЛЕ ИНОКУЛЯЦИИ ОПУХОЛИ	G1. НЕСУЩАЯ СРЕДА										G2. NTD					G3. Эпсилон-СО (1e6)					G4. Эпсилон-СО (2e5)					
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	329,67	242,62	743,49	581,48	465,02	73	36,41	184,25	84,31
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2148,61	736,43	3049,64	1111,11	733,62	101,67	297,34	97,52	48,29	192,99
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6139,29	6331,33	4301,27	7192,81	3089,58	9365,08	3182,9	12211,67	3785,66	5860,66
28																	2579,25	1767,5	1622,14	1958,58	837,7	16474,46	4720,97	7252,28	3340,53	3412,55
35																		5008,08	3562,14	3990,33	2107,82	1700,77	1017,8,57	3930,85	1136,2,67	1150,0,95
42																	2457,83	2160,15	1234,44	2256,06	1431,61	22877,85	8703,7	2144,69	6166,19	1286,0,52

Таблица 69 (продолжение 1)

G5. ЭПСИЛОН-СО (4e4)					G6. ЭПСИЛОН-СО (Δ181–185) (1e6)					G7. ЭПСИЛОН-СО (Δ181–185) (2e5)				
34,06	13,7	20,8	35,75	16,99	300,6	795,4	479,7	278,8	327,8	81,7	61,68	40,99	83,75	78,13
505,72	57,64	122,3	45,18	97,15	472,9	394,6	981,8	234	176,4	30,67	71,17	14,81	35,63	61,19
401,29	61,76	454,5	88,24	340,78	5370,22	2657,34	5684,36	2874,16	3215,74	5654,45	1536,44	10466,96	3611,35	3330,63
1103,8	339,0	4287,62	615,31	5737,18	1300,37	1804,74	2051,76	1742,52	1395,66	1362,23	1279,4,9	14279,97	0	5024,33
15541,85	1938,11	9038,63	2081,73	17734,86	557,62	1428,73	2884,78	2976,3	357,14	537,58	0	14614,3	7491,18	0
3477,81	0	6799,7	0	19946,81	1460,99	150,79	1142,48	1096,24	692,52	606,52	0	3477,12	8501,2	2880,75

Таблица 69 (продолжение 2)

G8. ЭПСИЛОН-СО (Δ181–185) (4e4)					G9. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (1e6)				
1,8	1,43	4,66	1,81	0	261,81	643,01	591,49	409,32	345,47
285,04	424,96	224,09	73,42	43,52	733,27	702,27		0	473,8
1092,8	823,42	728,76	1044,1	236,58	2493,42	2069,89	2244,9	3132,53	1287,73
1746,31	3692,52	197,69	1671,36	1826,92	833,9	1157,63	1465,59	1106,35	1096,41
2623,38	1837,27	1676,07	822,7	957,03	1216,49	1942,43	1989,27	1128,3	6210,77
3398,13	3627,85	1900,65	1966,69	1043,93	3768,39	0	3502	874,7	735,53

Таблица 69 (продолжение 3)

G10. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (2e5)					G11. ЭПСИЛОН-СО (R183K) (4e4)				
120,9	113,74	0	97,33	226,69	16,82	40,63	29,49	16,87	13,21
116,14	234,99	131,04	65,94	86,73	37,59	70,92	84,37	29,98	95,92
8213,58	3532,34	992,7	1203,93	2547,33	171,06	298,3	102,12	173,89	31,45
2378,69	4095,74	1510,42	1446,77	8071,43	732,54	2266,24	1123,09	1055,16	1785,71
5681,21	9858,1	2149,95	8534,67	7705,19	3992,95	400	1279,83	272,02	2291,99
7585,11	5750,69	1527,86	4683,12	5032,8		171,37	1902,79	90,23	

Таблица 69 (продолжение 4)

G12. ДЗЕТА 1xx (1e6)					G13. ДЗЕТА 1xx (2e5)					G14. ДЗЕТА 1xx (4e4)				
301,58	408,23	381,72	320,2	284,05	36,21	52,69	76,22	16,01	47,26	0	49,88	16	26,9	19,43
151,4	0	13,16	0	62,12	259,29	63,42	237,09	117,32	94,25	43,52	77,51	31,6	46,95	623,7
142,76	190,48	148,15	250,63	173,51	0	37,02	27,88	0	46	88,63	109,17		106,8	21,71
401,22	270,58	205,25	339,9	794,61	155,47	40,5	9,17	16,06	54,42	25,92	911,16	410,13	92,23	
446,99	513,91		2386,39	296,57	120,03	316,07	242,94	370,37	0	1041,12	0	0	380,23	
565,37	82,15	267,98	407,24	781,41	296,97	817,83	129,31	381,25	185,05	58,19	0	0	502,16	

[0347] В целом, в приведенной ниже формуле изобретения используемые термины не следует толковать как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но следует считать как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые претендует такая формула изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничивается настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:
анти-CD19 связывающий домен, имеющий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3; и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 2–4; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 5–7; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 8–10; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 12–14; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 15–17; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 18–20, или
где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 24–26; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 27–29; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 30–32; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 34–36; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 37–39; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 40–42;
трансмембранный домен;
костимулирующий домен; и
сигнальный домен, содержащий один из сигнального домена CD3ε, сигнального домена CD3γ, сигнального домена CD3δ или сигнального домена DAP12.

2. Анти-CD19 CAR по п. 1, содержащий переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, HCDR2, и HCDR3; и первый переменный домен легкой цепи, содержащий LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где:
переменный домен тяжелой цепи на по меньшей мере 80% идентичен SEQ ID NO: 1; и
переменный домен легкой цепи на по меньшей мере 80% идентичен SEQ ID NO: 11 или

вариабельный домен тяжелой цепи на по меньшей мере 80% идентичен
SEQ ID NO: 24; и

вариабельный домен легкой цепи на по меньшей мере 80% идентичен
SEQ ID NO: 33.

3. Анти-CD19 CAR по любому из пп. 1 или 2, в котором HCDR1, HCDR2, HCDR3; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 состоят из одного полипептида.

4. Анти-CD19 CAR по любому из пп. 1–3, в котором анти-CD19 связывающий домен содержит scFv.

5. Анти-CD19 CAR по п. 4, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность в соответствии с одной из SEQ ID NO: 21 или 43.

6. Анти-CD19 CAR по любому из пп. 1–5, в котором сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3ε с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 52.

7. Анти-CD19 CAR по любому из пп. 1–5, в котором сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3γ с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 57.

8. Анти-CD19 CAR по любому из пп. 1–5, в котором сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3δ с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 55.

9. Анти-CD19 CAR по любому из пп. 1–5, в котором сигнальный домен содержит сигнальный домен DAP12 с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 59.

10. Анти-CD19 CAR по любому из пп. 1–9, в котором трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD28.

11. Анти-CD19 CAR по любому из пп. 1–10, в котором костимулирующий домен содержит костимулирующий домен CD28.

12. Анти-CD19 CAR по любому из пп. 1–11, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 62, 65, 67 и 69.
13. Нуклеиновая кислота, кодирующая анти-CD19 CAR по любому из пп. 1–12.
14. Рекомбинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 13.
15. Клетка-хозяин, трансдуцированная с помощью нуклеиновой кислоты по п. 13 или рекомбинантного вектора по п. 14.
16. Клетка-хозяин по п. 15, которая содержит Т-клетку, инвариантную естественную киллерную Т-клетку (iNKT-клетка) или естественную клетку-киллера (NK-клетка).
17. Фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетку, iNKT-клетку и/или NK-клетку по п. 16.
18. Способ лечения заболевания у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту Т-клетки, iNKT-клетки и/или NK-клетки по п. 16 или фармацевтической композиции по п. 17.
19. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта или иммунизации субъекта против рака, который включает введение субъекту Т-клетки, iNKT-клетки и/или NK-клетки по п. 16 или фармацевтической композиции по п. 17.
20. Способ по п. 18 или 19, в котором рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) (включая не-Т-клеточный ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз (В-ОЛЛ), бластное новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический миелоидный лейкоз, хронический или острый лейкоз, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), волосатоклеточный лейкоз, болезнь Ходжкина, злокачественные лимфопролиферативные заболевания, лимфому MALT-типа, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, моноклональную гаммапатию неопределенного значения (МГНЗ), множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический

синдром, неходжкинскую лимфому (НХЛ), пролиферативное заболевание плазматических клеток (включая бессимптомную миелому (тлеющую множественную миелому), плазмобластную лимфому, новообразование из плазмоцитоидных дендритных клеток, плазмоцитому (включая плазмоклеточную дискразию; солитарную миелому; солитарную плазмоцитому; экстрамедуллярную плазмоцитому; и множественные плазмоцитомы), POEMS-синдром (также известный как синдром Кроу-Фукаса; болезнь Такатсуки; и PEP-синдром), первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (PMBC), мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), системный амилоидоз легкой цепи амилоидного белка, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз (Т-ОЛЛ), Т-клеточную лимфому, трансформированную фолликулярную лимфому или макроглобулинемию Вальденстрема, мантийноклеточную лимфому (МКЛ), трансформированную фолликулярную лимфому (ТФЛ), первичную медиастинальную В-клеточную лимфому (PMBCL), множественную миелому, волосатоклеточную лимфому/лейкоз или их комбинацию.

21. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий сигнальный домен CD3ε, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89.

22. CAR по п. 21, который содержит связывающий домен, специфичный к антигену, выбранному из группы, состоящей из 707-AP (707 аланин пролина), AFP (альфа (а)-фетопротеина), ART-4 (антигена аденокарциномы, распознаваемого клетками Т4), BAGE (антигена В; b-катенина/м, b-катенина/мутированного), BCMA (антигена созревания В-клеток), Vcr-abl (области кластера точки разрыва Абельсона), CAIX (карбоангидразы IX), CD19 (кластера дифференцировки 19), CD20 (кластера дифференцировки 20), CD22 (кластера дифференцировки 22), CD30 (кластера дифференцировки 30), CD33 (кластера дифференцировки 33), CD44v7/8 (кластера дифференцировки 44, экзоны 7/8), CAMEL (CTL-распознаваемого антигена меланомы), CAP-1 (карциноэмбрионального антигенного пептида-1), CASP-8 (каспазы-8), CDC27m (мутации 27 цикла клеточного деления), CDK4/m (мутации циклинзависимой киназы 4), SEA (карциноэмбрионального антигена), лектиноподобной молекулы-1 С-типа (CLL-1), CT (антигена рака яичек), Сур-В (циклофилина В), DAM (дифференцирующего антигена меланомы), EGFR (рецептора эпидермального фактора роста), EGFRvIII (рецептора эпидермального фактора роста, вариант III), EGP-2 (эпителиального гликопротеина 2), EGP-40 (эпителиального гликопротеина 40), Erbb2, 3, 4 (гомолога-2, -3, -4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза), ELF2M (фактора элонгации 2, мутированного), ETV6-AML1 (варианта Ets гена б/гена острого миелоидного лейкоза 1 ETS), FBP (фолат-

связывающего белка), fAchR (фетального ацетилхолинового рецептора), G250 (гликопротеина 250), GAGE (G-антигена), GD2 (дисиалоганглиозида 2), GD3 (дисиалоганглиозида 3), глипикан-3 (GPC3), GnT-V (N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V), Gp100 (гликопротеина с молекулярной массой 100 кДа), HAGE (антигена хеликозы), HER-2/neu (человеческого эпидермального рецептора-2/неврологического; также известного как EGFR2), HLA-A (человеческого лейкоцитарного антигена-A) HPV (вируса папилломы человека), HSP70-2M (белка теплового шока 70-2, мутированного), HST-2 (белка перстневидной опухоли человека-2), hTERT или hTRT (обратной транскриптазы теломеразы человека), iCE (кишечной карбоксиэстеразы), IL-13R-a2 (субъединицы альфа-2 рецептора интерлейкина-13), KIAA0205, KDR (рецептора домена вставки киназы), к-легкой цепи, LAGE (L-антигена), LDLR/FUT (липидного рецептора низкой плотности/GDP-L-фукозы: b-D-галактозидазы 2-а-L-фукозилтрансферазы), LeY (антитела Льюиса-Y), L1 CAM (молекулы клеточной адгезии L1), MAGE (антигена меланомы), MAGE-A1 (ассоциированного с меланомой антигена 1), мезотелина, инфицированных мышинным цитомегаловирусом (CMV) клеток, MART-1/Melan-A (антигена меланомы, распознаваемого Т-клетками-1/антигена меланомы A), MC1 R (рецептора меланокортинина 1), миозина/m (миозина мутированного), MUC1 (муцина 1), MUM-1, -2, -3 (белка меланомы с универсальными мутациями 1, 2, 3), NA88-A (клона кДНК NA пациента M88), лигандов NKG2D (группы естественных клеток-киллеров 2, члена D), NY-BR-1 (Нью-Йоркского антигена 1 дифференцировки молочной железы), NY-E SO-1 (Нью-Йоркского белка плоскоклеточной карциномы пищевода-1), онкофетального антигена (h5T4), P15 (белка 15), минорного белка p190 bcr-abl (белка bcr-abl с молекулярной массой 190 кД), Pml/RARa (рецептора а промиелоцитарного лейкоза/ретиноевой кислоты), PRAME (преимущественно экспрессируемого антигена меланомы), PSA (простат-специфического антигена), PSCA (антигена стволовых клеток предстательной железы), PSMA (специфического мембранного антигена предстательной железы), RAGE (почечного антигена), RU1 или RU2 (почечного универсального белка 1 или 2), SAGE (антигена саркомы), SART-1 или SART-3 (антигена, отторгающего плоскоклеточные опухоли 1 или 3), SSX1, -2, -3, -4 (белка синовиальной саркомы X1, -2, -3, -4), ТАА (опухолеассоциированного антигена), TAG-72 (опухолеассоциированного гликопротеина 72), TEL/AML1 (белка лейкоза семейства транслокации Ets/острого миелоидного лейкоза 1), TPI/m (тризофосфатазимеразы мутированной), TRP-1 (белка 1, родственного тирозинкиназе или gp75), TRP-2 (белка 2, родственного тирозиназе), TRP-2/INT2 (TRP-2/интрон 2), VEGF-R2 (рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов) и WT1 (гена опухоли Вильмса).

23. CAR по п. 21, который кодируется бицистронной конструкцией нуклеиновой кислоты.
24. CAR по любому из пп. 21–23, который содержит связывающий домен, специфичный к CD19.
25. CAR по п. 21, в котором сигнальный домен CD3ε кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81.
26. CAR по п. 21, отличающийся тем, что когда CAR экспрессируется в клетке, указанный CAR проявляет большую степень миграции в клеточную мембрану, чем соответствующий CAR с сигнальным доменом CD3ε дикого типа вместо сигнального домена CD3ε, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89.
27. Полинуклеотид, кодирующий CAR по п. 21.
28. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 27.
29. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 28.
30. Клетка-хозяин по п. 29, которая выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, iNKT-клетки или НК-клетки.
31. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку-хозяина по п. 29.
32. Способ лечения заболевания или состояния у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение клетки-хозяина по п. 29.
33. Способ получения CAR Т-клетки, включающий обеспечение экспрессии CAR по п. 21.
34. Сигнальный домен CD3ε, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89.
35. Сигнальный домен CD3ε по п. 34, который кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81.
36. Сигнальный домен CD3ε по п. 34, который содержится в химерном антигенном рецепторе (CAR).
37. Сигнальный домен CD3ε по п. 36, отличающийся тем, что CAR содержит связывающий домен, специфичный к антигену, выбранному из группы, состоящей из 707-AP (707 аланин пролина), AFP (альфа (α)-фетопротейна), ART-4 (антигена аденокарциномы, распознаваемого клетками Т4), BAGE (антигена В; b-катенина/m, b-катенина/мутированного), BCMA (антигена созревания В-клеток), Vcr-abl (области кластера точки разрыва Абельсона), CAIX (карбоангидразы IX), CD19 (кластера

дифференцировки 19), CD20 (кластера дифференцировки 20), CD22 (кластера дифференцировки 22), CD30 (кластера дифференцировки 30), CD33 (кластера дифференцировки 33), CD44v7/8 (кластера дифференцировки 44, экзоны 7/8), CAMEL (CTL-распознаваемого антигена меланомы), CAP-1 (карциноэмбрионального антигенного пептида-1), CASP-8 (каспазы-8), CDC27m (мутации 27 цикла клеточного деления), CDK4/m (мутации циклинзависимой киназы 4), CEA (карциноэмбрионального антигена), лектиноподобной молекулы-1 С-типа (CLL-1), CT (антигена рака яичек), Сур-В (циклофилина В), DAM (дифференцирующего антигена меланомы), EGFR (рецептора эпидермального фактора роста), EGFRvIII (рецептора эпидермального фактора роста, вариант III), EGP-2 (эпителиального гликопротеина 2), EGP-40 (эпителиального гликопротеина 40), Erbb2, 3, 4 (гомолога-2, -3, -4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза), ELF2M (фактора элонгации 2, мутированного), ETV6-AML1 (варианта Ets гена б/гена острого миелоидного лейкоза 1 ETS), FBP (фолат-связывающего белка), fAChR (фетального ацетилхолинового рецептора), G250 (гликопротеина 250), GAGE (G-антигена), GD2 (дисиаialogанглиозида 2), GD3 (дисиаialogанглиозида 3), глипикан-3 (GPC3), GnT-V (N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V), Gp100 (гликопротеина с молекулярной массой 100 кДа), HAGE (антигена хеликозы), HER-2/neu (человеческого эпидермального рецептора-2/неврологического; также известного как EGFR2), HLA-A (человеческого лейкоцитарного антигена-A) HPV (вируса папилломы человека), HSP70-2M (белка теплового шока 70-2, мутированного), HST-2 (белка перстневидной опухоли человека-2), hTERT или hTRT (обратной транскриптазы теломеразы человека), iCE (кишечной карбоксиэстеразы), IL-13R-a2 (субъединицы альфа-2 рецептора интерлейкина-13), KIAA0205, KDR (рецептора домена вставки киназы), к-легкой цепи, LAGE (L-антигена), LDLR/FUT (липидного рецептора низкой плотности/GDP-L-фукозы: b-D-галактозидазы 2-а-L-фукозилтрансферазы), LeY (антитела Льюиса-Y), L1 CAM (молекулы клеточной адгезии L1), MAGE (антигена меланомы), MAGE-A1 (ассоциированного с меланомой антигена 1), мезотелина, инфицированных мышинным CMV клеток, MART-1/Melan-A (антигена меланомы, распознаваемого Т-клетками-1/антигена меланомы А), MC1 R (рецептора меланокортина 1), миозина/m (миозина мутированного), MUC1 (муцина 1), MUM-1, -2, -3 (белка меланомы с универсальными мутациями 1, 2, 3), NA88-A (клона кДНК NA пациента M88), лигандов NKG2D (группы естественных клеток-киллеров 2, члена D), NY-BR-1 (Нью-Йоркского антигена 1 дифференцировки молочной железы), NY-E SO-1 (Нью-Йоркского белка плоскоклеточной карциномы пищевода-1), онкофетального антигена (h5T4), P15 (белка 15), минорного белка p190 bcr-abl (белка bcr-abl с молекулярной массой 190 кД), Pml/RARa (рецептора а промиелоцитарного

лейкоза/ретиноевой кислоты), PRAME (преимущественно экспрессируемого антигена меланомы), PSA (простат-специфического антигена), PSCA (антигена стволовых клеток предстательной железы), PSMA (специфического мембранного антигена предстательной железы), RAGE (почечного антигена), RU1 или RU2 (почечного универсального белка 1 или 2), SAGE (антигена саркомы), SART-1 или SART-3 (антигена, отторгающего плоскоклеточные опухоли 1 или 3), SSX1, -2, -3, -4 (белка синовиальной саркомы X1, -2, -3, -4), TAA (опухолеассоциированного антигена), TAG-72 (опухолеассоциированного гликопротеина 72), TEL/AML1 (белка лейкоза семейства транслокации Ets/острого миелоидного лейкоза 1), TPI/m (триозофосфатизомеразы мутированной), TRP-1 (белка 1, родственного тирозиназе, или gp75), TRP-2 (белка 2, родственного тирозиназе), TRP-2/INT2 (TRP-2/интрон 2), VEGF-R2 (рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов) и WT1 (гена опухоли Вильмса).

38. Сигнальный домен CD3ε по п. 36, отличающийся тем, что CAR кодируется бицистронной конструкцией нуклеиновой кислоты.

39. Сигнальный домен CD3ε по любому из пп. 36–38, отличающийся тем, что CAR содержит связывающий домен, специфичный к CD19.

40. Сигнальный домен CD3ε по п. 36, отличающийся тем, что когда CAR экспрессируется в клетке, CAR проявляет большую степень миграции в клеточную мембрану, чем соответствующий CAR с сигнальным доменом CD3ε дикого типа вместо сигнального домена CD3ε, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89.

41. Полинуклеотид, кодирующий сигнальный домен CD3ε по п. 34.

42. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 41.

43. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 42.

44. Клетка-хозяин по п. 43, которая выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, iNKT-клетки или NK-клетки.

45. Способ лечения заболевания или состояния у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение клетки-хозяина по п. 43.

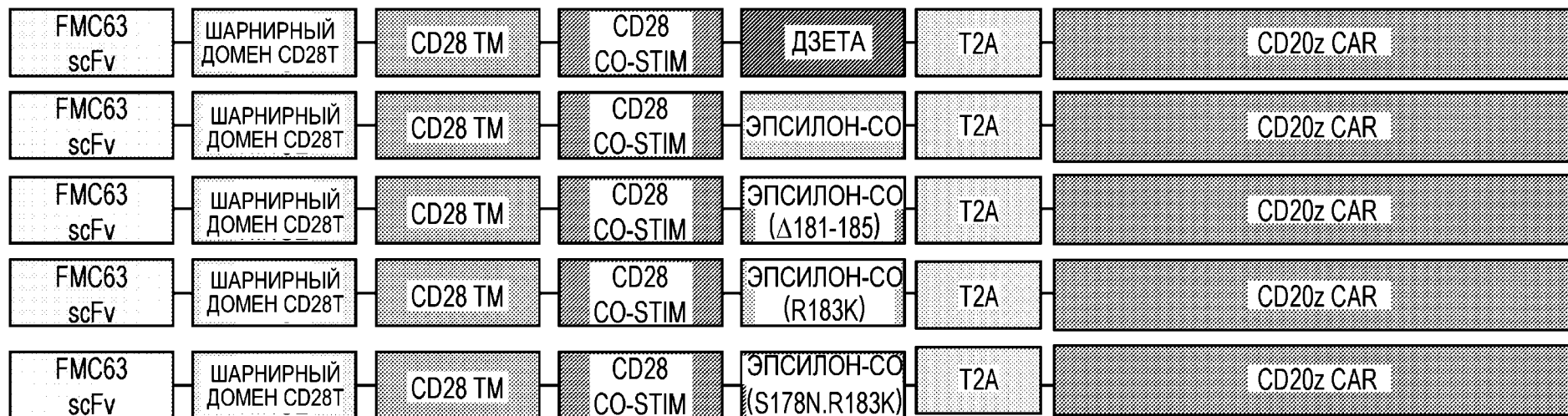
46. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку-хозяина по п. 43.

47. Способ получения CAR Т-клетки, включающий обеспечение экспрессии CAR по п. 36.

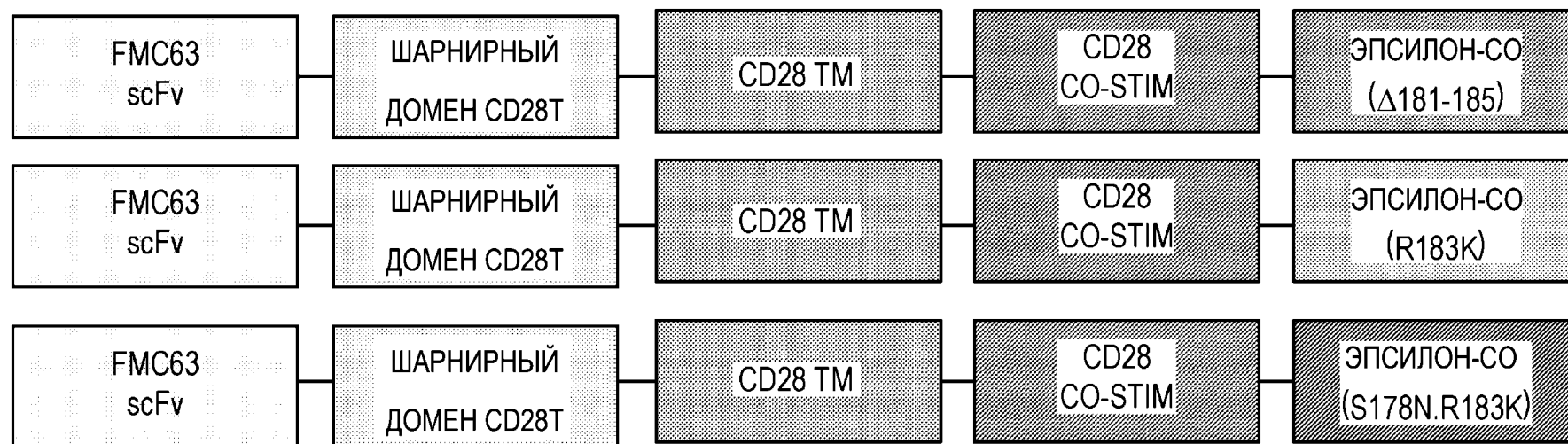
48. Способ улучшения направленной миграции CAR в клеточную мембрану, в котором CAR сконструирован для экспрессии сигнального домена CD3ε, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 89.

49. Способ по п. 48, в котором сигнальный домен CD3ε кодируется нуклеиновой кислотой, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81.

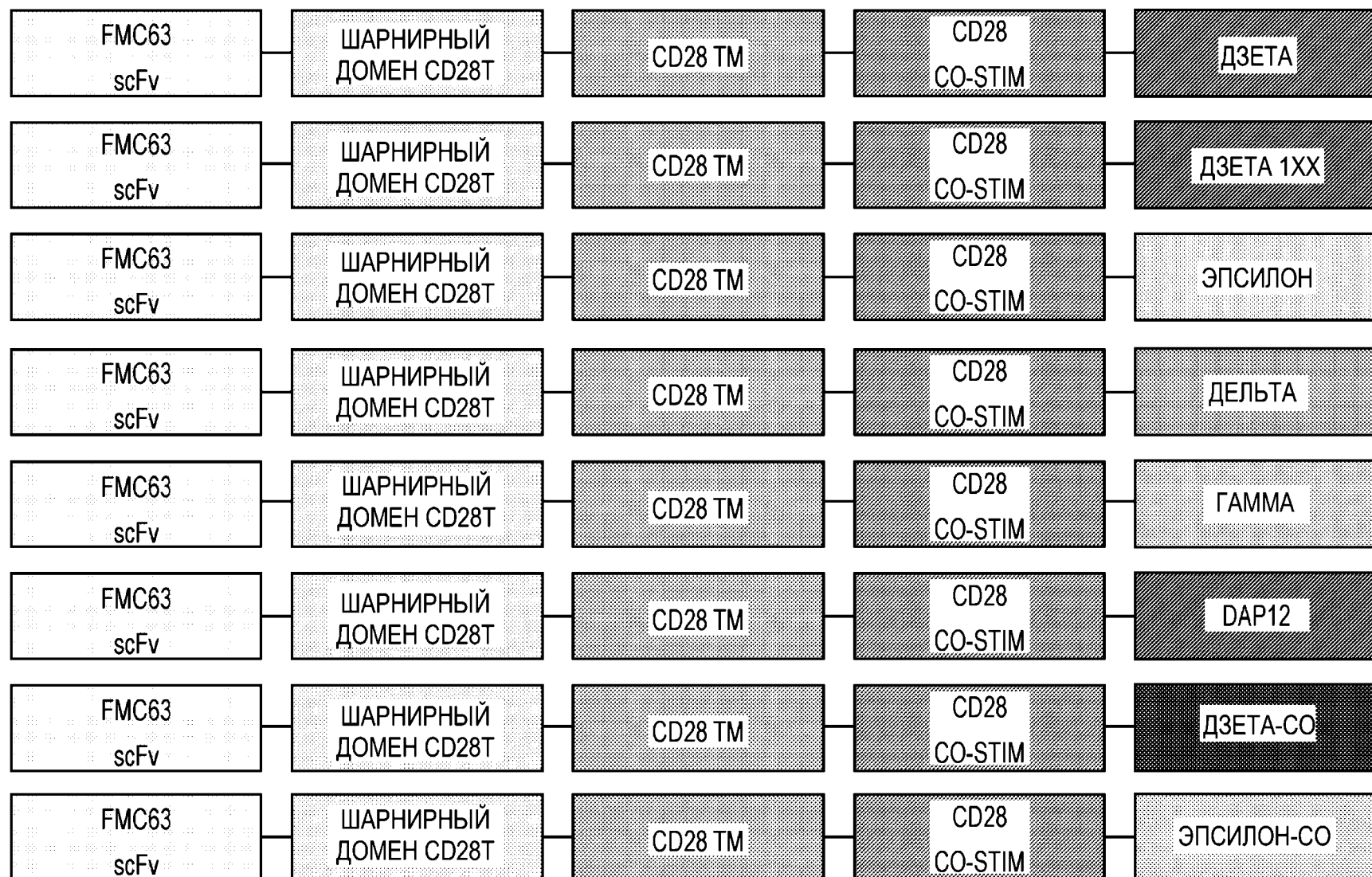
50. Способ улучшения направленной миграции CAR в клеточную мембрану, в котором CAR сконструирован для включения сигнального домена CD3ε, имеющего одну или более мутаций, делеций или вставок в сигнальный домен CD3ε дикого типа.



ФИГ. 1



ФИГ. 2

**ФИГ. 3**