



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 35/17 (2020.08); A61K 38/204 (2020.08); A61K 39/395 (2020.08); C07K 14/5412 (2020.08); C07K 14/5434 (2020.08); C07K 14/7051 (2020.08); C07K 14/70521 (2020.08); C07K 16/2887 (2020.08); C07K 16/2896 (2020.08); C07K 16/30 (2020.08); C12N 5/0636 (2020.08); A61K 2039/505 (2020.08); C07K 2317/53 (2020.08); C07K 2317/56 (2020.08); C07K 2319/035 (2020.08); C12N 2510/00 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2017138528, 25.04.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.04.2016

Дата регистрации:
16.02.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.04.2015 US 62/151,968;
07.05.2015 US 62/158,407

(43) Дата публикации заявки: 07.05.2019 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 16.02.2021 Бюл. № 5

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 07.11.2017

(86) Заявка РСТ:
US 2016/029203 (25.04.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/172703 (27.10.2016)

Адрес для переписки:
123242, Москва, пл. Кудринская, д. 1, а/я 35,
"Михайлюк, Сороколат и партнеры -
патентные поверенные"

(72) Автор(ы):

МИКЛТУЭЙТ, Кеннет (AU),
ДАНН, Розан (AU),
ГОТТЛИБ, Дэвид (AU),
ЛОГАН, Грант (AU)

(73) Патентообладатель(и):

ХЕМАЛОДЖИКС ПТИ. ЛТД. (AU)

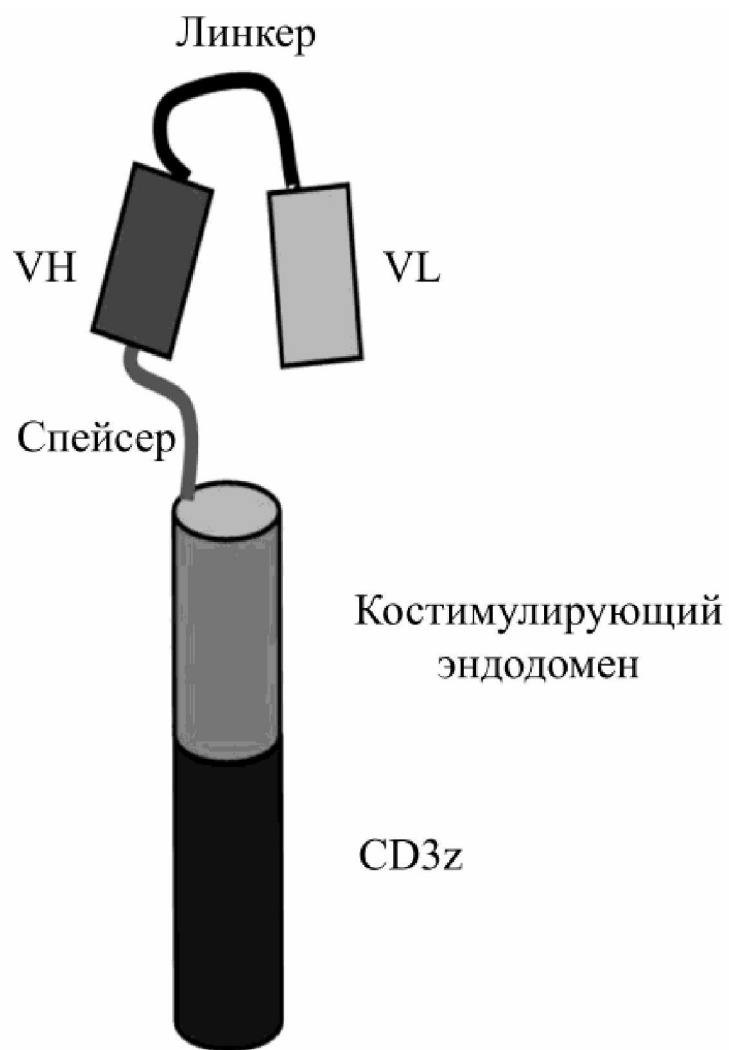
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: VERA J et. al. "T lymphocytes
redirected against the κ light chain of human
immunoglobulin efficiently kill mature B
lymphocyte-derived malignant cells", Blood, 2006,
Vol. 108. No. 12, pp. 3890-3897. WO 2010/115238
A1 14.10.2010. HOMBACH AA, ABKEN H
"Costimulation by chimeric antigen receptors
revisited: the T cell antitumor response benefits
(см. прод.)

(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К КАППА-АНТИГЕНУ МИЕЛОМЫ И ВАРИАНТЫ
ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области
иммунологии. Предложены химерный антигенный
рецептор к каппа-антигену миеломы (КМА),
генетически модифицированная Т-клетка, способ
получения генетически модифицированной Т-

клетки, применение генетически
модифицированной Т-клетки. Данное изобретение
может найти дальнейшее применение в терапии
КМА-экспрессирующих злокачественных
новообразований. 4 н. и 16 з.п. ф-лы, 23 ил., 5 пр.



Фиг. 2

(56) (продолжение):

from combined CD28-OX40 signalling", Int. J. Cancer, 2011, Vol. 129, pp. 2935-2944. WO 2014/190273 A1 27.11.2014. WO 2015/009740 A2 22.01.2015. WO 2003/004056 A1 16.01.2003. HUSTON JS et. al. "Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, Vol. 85, pp. 5879-5883. БЕССМЕЛЬЦЕВ СС "Множественная миелома (патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз)", Клиническая онкогематология, 2013, Т. 6, No. 3, стр. 237-267.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/725 (2006.01)*C07K 19/00* (2006.01)*C12N 5/0783* (2010.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 35/17 (2020.08); *A61K 38/204* (2020.08); *A61K 39/395* (2020.08); *C07K 14/5412* (2020.08); *C07K 14/5434* (2020.08); *C07K 14/7051* (2020.08); *C07K 14/70521* (2020.08); *C07K 16/2887* (2020.08); *C07K 16/2896* (2020.08); *C07K 16/30* (2020.08); *C12N 5/0636* (2020.08); *A61K 2039/505* (2020.08); *C07K 2317/53* (2020.08); *C07K 2317/56* (2020.08); *C07K 2319/035* (2020.08); *C12N 2510/00* (2020.08)

(21)(22) Application: **2017138528, 25.04.2016**(24) Effective date for property rights:
25.04.2016Registration date:
16.02.2021

Priority:

(30) Convention priority:
23.04.2015 US 62/151,968;
07.05.2015 US 62/158,407(43) Application published: **07.05.2019 Bull. № 13**(45) Date of publication: **16.02.2021 Bull. № 5**(85) Commencement of national phase: **07.11.2017**(86) PCT application:
US 2016/029203 (25.04.2016)(87) PCT publication:
WO 2016/172703 (27.10.2016)

Mail address:

123242, Moskva, pl. Kudrinskaya, d. 1, a/ya 35,
"Mikhajlyuk, Sorokolat i partnery - patentnye
poverennyye"

(72) Inventor(s):

MICKLETHWAITE, Kenneth (AU),
DUNN, Rosanne (AU),
GOTTLIEB, David (AU),
LOGAN, Grant (AU)

(73) Proprietor(s):

HAEMALOGIX PTY. LTD. (AU)(54) **CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS TO MYELOMA KAPPA ANTIGEN AND VERSIONS OF THEIR APPLICATION**

(57) Abstract:

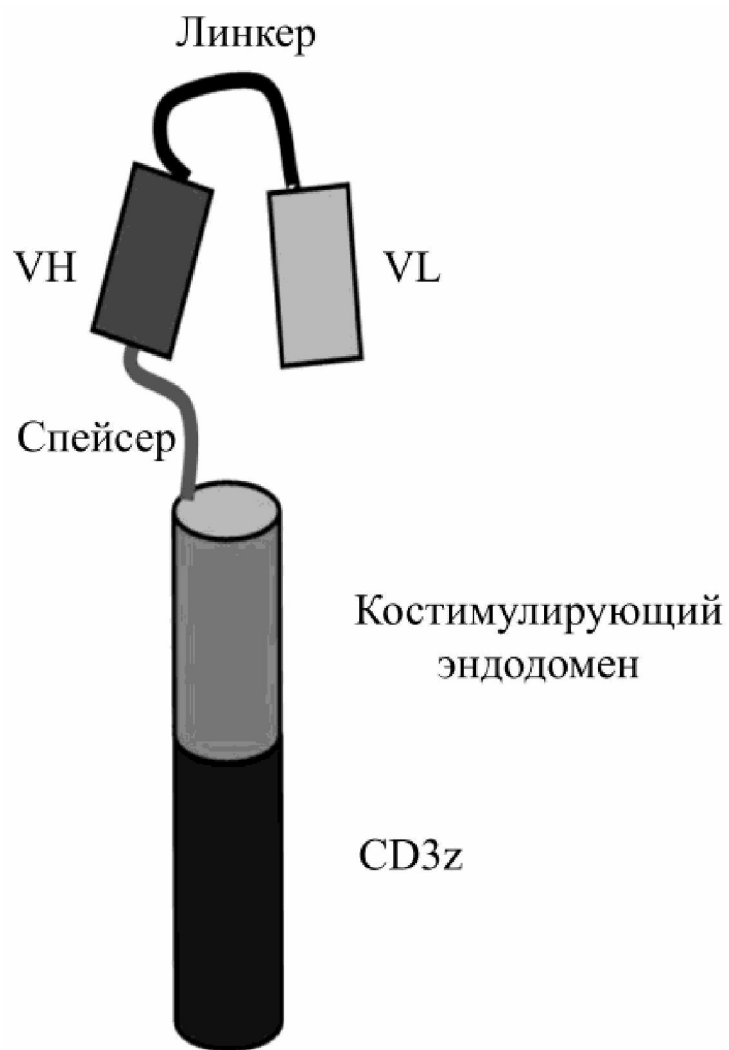
FIELD: immunology.

SUBSTANCE: what is presented is a chimeric antigenic receptor for myeloma kappa antigen (KMA), a genetically modified T cell, a method for producing a genetically modified T cell, using a genetically

modified T cell.

EFFECT: present invention can find further application in therapy of KMA-expressing malignant growths.

20 cl, 23 dwg, 5 ex



Фиг. 2

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА НЕПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ЗАЯВКИ НА ПАТЕНТ США

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США сер. № 62/151968, поданной 23 апреля 2015 г., и предварительной заявке на патент США сер. № 62/158407, поданной 7 мая 2015 г., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки полностью для любых целей.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Связанный с настоящей заявкой перечень последовательностей предоставлен в текстовом формате, заменяющем бумажную копию, и включен в настоящее описание посредством ссылки. Название текстового файла, содержащего указанный перечень последовательностей: HMLX_002_02WO_SeqList_ST25.txt. Размер указанного текстового файла составляет приблизительно 24 Кб, он был создан 23 апреля 2016 г. и подан в электронном виде через EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественное новообразование плазматических клеток костного мозга, которое остается неизлечимым, несмотря на последние достижения в терапии. Его клиническое течение характеризуется первоначальным ответом на терапию, за которым следуют многократные рецидивы с развитием в конечном счете устойчивости ко всем формам лечения. Оно также сопряжено со значительной смертностью и инвалидизацией, обусловленными как собственно заболеванием, так и токсичностью доступных вариантов лечения.

[0004] Множественная миелома характеризуется злокачественными плазматическими клетками, которые секретируют ограниченный по легкой цепи каппа или лямбда моноклональный парапротеин. Ограничение по каппа имеет место у 60% пациентов с миеломой, и экспрессия каппа-антигена миеломы (КМА) в большой степени ограничена множественной миеломой и В-клеточными злокачественными новообразованиями. КарраМаб представляет собой КМА-специфическое моноклональное антитело, которое продемонстрировало безопасность и эффективность в клинических испытаниях фазы I и II.

[0005] Лечение только моноклональными антителами не приводит к излечению, обеспечивая неполную эрадикацию опухоли, что в конечном счете приводит к рецидиву. Это может быть обусловлено неадекватным проникновением антитела в опухоль (путем пассивной диффузии), гетерогенностью экспрессии антигена на опухолевых клетках или устойчивостью опухолевых клеток к механизмам антителозависимой цитотоксичности. Соответственно, имеется потребность в эффективных средствах терапии с низкой токсичностью, которые могут обеспечивать долгосрочное излечение заболевания.

[0006] Несущие химерный антигенный рецептор Т-клетки (CAR-Т-клетки) представляют собой возможное решение указанной проблемы. CAR-Т-клетки содержат антигенсвязывающий домен моноклональных антител с одним или больше внутриклеточным(и) сигнальным(и) доменом(ами) Т-клеток для получения локализованного опухолеспецифичного иммунного ответа. CAR-Т-клетки обладают несколькими преимуществами по сравнению с моноклональными антителами: они активно мигрируют в опухоль, пролиферируют в ответ на несущие антиген опухолевые клетки, секретируют факторы, которые мобилизуют другие ветви иммунного ответа и способны выживать в течение длительного времени, обеспечивая продолжительную защиту от рецидива. Другое преимущество CAR-Т-клетки по сравнению с терапевтическим антителом, нацеленным на тот же антиген, заключается в том, что

CAR-T-клетка может также быть дополнительно модифицирована для повышения безопасности и улучшения функции. Например, Т-клетка может быть модифицирована таким образом, чтобы включать экспрессию хоминг-рецептора, повышающего специфичность Т-клетки и способность указанной(ых) Т-клетки(ток) к инфильтрации раковых клеток или опухолей, или они могут содержать «выключатель», функция которого может заключаться в элиминации клеток в случае появления токсичности. Кроме того, что важно при лечении множественной миеломы и связанных нарушений, Т-клетка может быть модифицирована для экспрессии дополнительных биологически активных или фармацевтически активных молекул, которые могут усиливать противоопухолевый ответ, таких как, например, подавляющие опухолевый рост цитокины. Как описано в настоящем документе, авторы настоящего изобретения разработали новые конструкции CAR, способные специфически связываться с конкретным конформационным эпитопом КМА, экспрессируемым только на клетках ММ, и сконструировали CAR-Т-клетки для экспрессии внеклеточного антигенсвязывающего домена, специфического для указанного эпитопа, и внутриклеточного Т-клеточного сигнального домена, отдельно или в комбинации с экспрессией других противоопухолевых иммунных медиаторов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), специфическим в отношении каппа-антигена миеломы (КМА), и при этом содержащим внутриклеточные сигнальные домены, способные запускать Т-клеточный ответ против КМА, Т-клеткам, содержащим такие CAR, и способу лечения множественной миеломы и связанных расстройств путем введения Т-клеток, экспрессирующих КМА-специфические CAR. Получаемые CAR-Т-клетки способны опосредовать направленный иммунный ответ против раковых клеток, и в то же время не дают нежелательных побочных эффектов, связанных с системной доставкой моноклональных антител и/или противоопухолевых цитокинов.

[0008] В одном варианте реализации химерные антигенные рецепторы (CAR) согласно настоящему изобретению содержат один или больше внутриклеточных сигнальных доменов и внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически распознает каппа-антиген миеломы (КМА). В одном варианте реализации указанный внутриклеточный сигнальный домен представляет собой один или больше костимулирующих эндодоменов. В еще одном варианте реализации указанный один или больше костимулирующих доменов представляет собой что-либо одно или больше из домена CD28, домена CD3 ζ , домена 4-1BB или домена OX-40, или их комбинаций. В одном варианте реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ и домен CD28. В другом варианте реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ и домен OX-40. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , домен CD28 и домен OX-40. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ и домен 4-1BB. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , домен CD28 и домен 4-1BB. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , домен 4-1BB и домен OX-40.

[0009] В одном варианте реализации указанный внеклеточный связывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически

распознает КМА. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит определяющие комплементарность участки (участки CDR), происходящие из КаппаMab. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит участки CDR VL (CDR варибельной области легкой цепи) последовательностей SEQ ID NO: 6-8. Согласно

еще одному варианту реализации указанный scFv содержит область VL последовательности SEQ ID NO: 21. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит участки CDR VH (CDR варибельной области тяжелой цепи) последовательностей SEQ ID NO: 3-5. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит область VH последовательности SEQ ID NO: 22. В еще одном дополнительном варианте реализации указанный scFv содержит участки CDR VL последовательностей SEQ ID NO: 6-8 и участки CDR VH последовательностей SEQ ID NO: 3-5. В еще одном дополнительном варианте реализации указанный scFv содержит область VL последовательности SEQ ID NO: 21 и область VH последовательности SEQ ID NO: 22. В одном варианте реализации указанные VL-цепь последовательности SEQ ID NO: 2 и VH-цепь последовательности SEQ ID NO: 1 присоединены глицин-сериновым линкером. В одном варианте реализации указанные область VL последовательности SEQ ID NO: 21 и область VH последовательности SEQ ID NO: 22 присоединены глицин-сериновым линкером. Согласно еще одному варианту реализации указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот. Согласно еще одному варианту реализации указанный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер размером 15 аминокислот и содержит (Gly₄Ser)₃. В одном варианте реализации указанный (Gly₄Ser)₃-линкер представляет собой последовательность SEQ ID NO: 23.

В одном варианте реализации указанный scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным сигнальным доменам спейсером. Согласно еще одному варианту реализации scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным доменам спейсером, который содержит константную область иммуноглобулина. В одном варианте реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит что-либо одно или больше из шарнира IgG, CH2-домена IgG и CH3-домена IgG. Согласно конкретному варианту реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит шарнирный домен иммуноглобулина. Согласно еще одному варианту реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит CH3-домен иммуноглобулина. Согласно еще одному варианту реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит CH2-домен IgG. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным доменам спейсером, который содержит CD8 α -домен. В одном варианте реализации указанный спейсер присоединен к scFv глицин-сериновым линкером. Согласно еще одному варианту реализации указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот. Согласно еще одному варианту реализации указанный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер размером 15 аминокислот и содержит (Gly₄Ser)₃. В одном варианте реализации указанный (Gly₄Ser)₃ линкер представляет собой последовательность SEQ ID NO: 23.

[0010] В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает Т-клетки, содержащие химерные антигенные рецепторы (CAR-Т-клетки). В одном варианте реализации указанные CAR-Т-клетки содержат CAR, содержащие один или больше внутриклеточных сигнальных доменов и внеклеточный связывающий домен. Согласно конкретному варианту реализации указанный внеклеточный связывающий домен специфически распознает каппа-антиген миеломы. В одном варианте реализации

указанные CAR-T-клетки сконструированы с дополнительной возможностью экспрессии одной или больше дополнительных биологической молекулы. В одном варианте реализации указанные дополнительные одна или больше молекул содержат ИЛ-12 и/или SANT7 и/или галектин-3С (GAL3C). В одном варианте реализации указанные CAR-T-клетки экспрессируют одноцепочечный полипептид, содержащий одну субъединицу р35 ИЛ-12 и одну субъединицу р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером. В одном варианте реализации указанный ИЛ-12 р35 и ИЛ-12 р40 соединены (G₄S)₃-линкером.

В одном варианте реализации указанный одноцепочечный полипептид ИЛ-12 образует биоактивный гетеродимер р70 ИЛ-12. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12 и селективный маркер (маркер отбора). В одном варианте реализации указанная одна или больше биологических молекул представляет SANT7. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует GAL3C. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует SANT7 и GAL3C. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует SANT7, GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12 и GAL3C. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12, GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12, GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует SANT7 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12 и SANT7. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12, SANT7 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12, SANT7 и GAL3C. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12, SANT7, GAL3C и селективный маркер.

[0011] В одном варианте реализации CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению также экспрессируют связывающий фактор роста гепатоцитов (ФРГ) белок, который способен ингибировать ФРГ-сигнализацию и эффекторную функцию. Согласно одному аспекту указанный ФРГ-связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент.

[0012] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения генетически модифицированной Т-клетки, включающий введение экспрессионного вектора, кодирующего CAR, содержащий один или больше внутриклеточных сигнальных доменов и внеклеточный антигенсвязывающий домен, в Т-клетку. Согласно конкретному варианту реализации указанный внеклеточный антигенсвязывающий домен специфически распознает КМА. В одном варианте реализации указанный экспрессионный вектор представляет собой экспрессионную систему на основе транспозируемого вектора. В некоторых вариантах реализации указанный экспрессионный вектор представляет собой экспрессионный вектор с транспозоном PiggyBac. В другом варианте реализации указанный экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор. В одном варианте реализации указанный вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или ретровирусный вектор. В одном варианте реализации указанный экспрессионный вектор вводят в клетки путем электропорации. В одном варианте реализации указанный один или больше внутриклеточных сигнальных доменов в CAR представляет собой один или больше костимулирующих эндодоменов. В еще одном варианте реализации указанный один или больше костимулирующих доменов представляет собой что-либо одно или больше из домена CD28, домена CD3 ζ , домена 4-1BB или домена OX-40, или их комбинаций. В одном варианте реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов

CAR содержит домен CD3 ζ и домен CD28. В другом варианте реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ и домен OX-40. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , домен CD28 и домен OX-40. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ и домен 4-1BB. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , домен CD28 и домен 4-1BB. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , домен 4-1BB и домен OX-40. В одном варианте реализации указанный внеклеточный связывающий домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически распознает КМА. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит определяющие комплементарность участки (участки CDR), происходящие из KappaMab. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит участки CDR VL последовательностей SEQ ID NO: 6-8. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит область VL последовательности SEQ ID NO: 21. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит участки CDR VH последовательностей SEQ ID NO: 3-5. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит область VH последовательности SEQ ID NO: 22. В еще одном дополнительном варианте реализации указанный scFv содержит участки CDR VL последовательностей SEQ ID NO: 6-8 и участки CDR VH последовательностей SEQ ID NO: 3-5. В еще одном дополнительном варианте реализации указанный scFv содержит область VL последовательности SEQ ID NO: 21 и область VH последовательности SEQ ID NO: 22. В одном варианте реализации указанные VL-цепь последовательности SEQ ID NO: 2 и VH-цепь последовательности SEQ ID NO: 1 присоединены глицин-сериновым линкером. В одном варианте реализации указанные область VL последовательности SEQ ID NO: 21 и область VH последовательности SEQ ID NO: 22 присоединены глицин-сериновым линкером. Согласно еще одному варианту реализации указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот. Согласно еще одному варианту реализации указанный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер размером 15 аминокислот и содержит (Gly₄Ser)₃. В одном варианте реализации указанный (Gly₄Ser)₃-линкер представляет собой последовательность SEQ ID NO: 23.

В одном варианте реализации указанный scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным сигнальным доменам спейсером. Согласно еще одному варианту реализации scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным доменам спейсером, который содержит константную область иммуноглобулина. В одном варианте реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит что-либо одно или больше из шарнира IgG, CH2-домена IgG и CH3-домена IgG. Согласно конкретному варианту реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит шарнирный домен иммуноглобулина. Согласно еще одному варианту реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит CH3-домен иммуноглобулина. Согласно еще одному варианту реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит CH2-домен IgG. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным доменам спейсером, который содержит CD8 α -домен. В одном варианте реализации указанный спейсер присоединен к scFv глицин-сериновым линкером. Согласно еще одному варианту реализации указанный глицин-сериновый линкер представляет собой

линкер из 15-20 аминокислот. Согласно еще одному варианту реализации указанный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер размером 15 аминокислот и содержит (Gly₄Ser)₃. В одном варианте реализации указанный (Gly₄Ser)₃ линкер представляет собой последовательность SEQ ID NO: 23. В одном варианте реализации указанный способ дополнительно включает введение одного или больше дополнительных экспрессионных векторов, сконструированных с возможностью экспрессии одной или больше дополнительных биологических молекул. В одном варианте реализации указанная дополнительная одна или больше молекул содержит ИЛ-12, и/или SANT7, и/или GAL3C. В одном варианте реализации указанный один или больше дополнительных экспрессионных векторов содержит последовательность, кодирующую одноцепочечный полипептид, содержащий одну субъединицу р35 ИЛ-12 и одну субъединицу р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером. В одном варианте реализации указанные р35 ИЛ-12 и р40 ИЛ-12 соединены (G₄S)₃-линкером. В одном варианте реализации указанная последовательность, кодирующая одноцепочечный полипептид ИЛ-12, кодирует биоактивный гетеродимер р70 ИЛ-12. В одном варианте реализации указанный экспрессионный вектор, экспрессирующий один или больше биологически активных агентов, также содержит селективный маркер. В одном варианте реализации указанный экспрессионный вектор содержит последовательность, кодирующую одноцепочечный полипептид ИЛ-12, содержащий р35 ИЛ-12 и р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, и селективный маркер, соединенный с одноцепочечным ИЛ-12 элементом «рибосомального перепрыгивания» 2А. В одном варианте реализации указанная одна или больше биологических молекул представляет собой SANT7. В одном варианте реализации указанный экспрессионный вектор, экспрессирующий один или больше биологически активных агентов, содержит SANT7 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная последовательность, кодирующая SANT7 и селективный маркер, соединены последовательностью элемента «рибосомального перепрыгивания» 2А. В одном варианте реализации указанный экспрессионный вектор, экспрессирующий один или больше биологически активных агентов, содержит GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная последовательность, кодирующая GAL3C и селективный маркер, соединена последовательностью элемента «рибосомального перепрыгивания». В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка содержит ИЛ-12, SANT7 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная последовательность, кодирующая ИЛ-12, соединена с селективным маркером элементом «рибосомального перепрыгивания» 2А, и указанная последовательность, кодирующая SANT7, соединена с последовательностью, кодирующей ИЛ-12, дополнительным элементом «рибосомального перепрыгивания» 2А. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка содержит GAL3C, SANT7 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная последовательность, кодирующая GAL3C, соединена с селективным маркером элементом «рибосомального перепрыгивания» 2А, и указанная последовательность, кодирующая SANT7, соединена с последовательностью, кодирующей GAL3C, дополнительным элементом «рибосомального перепрыгивания» 2А. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка содержит ИЛ-12, GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная последовательность, кодирующая ИЛ-12, соединена с селективным маркером элементом «рибосомального перепрыгивания» 2А, и указанная последовательность, кодирующая GAL3C, соединена с последовательностью, кодирующей ИЛ-12, дополнительным элементом «рибосомального перепрыгивания» 2А. В одном варианте реализации указанная CAR-T-клетка содержит GAL3C, SANT7, ИЛ-12 и селективный

маркер. В одном варианте реализации указанная последовательность, кодирующая каждый из GAL3C, SANT7, ИЛ-12 и селективный маркер, соединена последовательностью элемента «рибосомального перепрыгивания» 2А.

[0013] В одном варианте реализации предложен способ лечения КМА-

- 5 экспрессирующего злокачественного новообразования. В одном варианте реализации указанное КМА-экспрессирующее злокачественное новообразование представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В еще одном варианте реализации указанное В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, диффузную В-
- 10 крупноклеточную лимфому (ДВККЛ) или амилоидоз. Согласно конкретному варианту реализации указанный способ включает введение субъекту с множественной миеломой, макроглобулинемией Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), амилоидозом или другим В-клеточным злокачественным новообразованием, экспрессирующим КМА, генетически модифицированных Т-клеток, сконструированных
- 15 с возможностью экспрессии одного или больше внутриклеточных сигнальных доменов и внеклеточного антигенсвязывающего домена, который специфически распознает КМА. В одном варианте реализации указанный один или больше внутриклеточных сигнальных доменов в CAR представлен(ы) одним или больше костимулирующими эндодоменами. В еще одном варианте реализации указанный один или больше
- 20 костимулирующих доменов представляет собой что-либо одно или больше из домена CD28, домена CD3 ζ , домена 4-1BB или домена OX-40, или их комбинаций. В одном варианте реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ и домен CD28. В другом варианте реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , и домен OX-
- 25 40. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , домен CD28 и домен OX-40. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ и домен 4-1BB. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , домен CD28 и домен 4-1BB. Согласно еще
- 30 одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3 ζ , домен 4-1BB и домен OX-40. В одном варианте реализации указанный внеклеточный связывающий домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически распознает КМА. Согласно еще
- 35 одному варианту реализации указанный scFv содержит определяющие комплементарность участки (участки CDR), происходящие из KappaMab. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит участки CDR VL последовательностей SEQ ID NO: 6-8. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит область VL последовательности SEQ ID NO: 21. Согласно
- 40 еще одному варианту реализации указанный scFv содержит участки CDR VH последовательностей SEQ ID NO: 3-5. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит область VH последовательности SEQ ID NO: 22. В еще одном дополнительном варианте реализации указанный scFv содержит участки CDR VL последовательностей SEQ ID NO: 6-8 и участки CDR VH последовательностей SEQ ID
- 45 NO: 3-5. В еще одном дополнительном варианте реализации указанный scFv содержит область VL последовательности SEQ ID NO: 21 и область VH последовательности SEQ ID NO: 22. В одном варианте реализации указанные VL-цепь последовательности SEQ ID NO: 2 и VH-цепь последовательности SEQ ID NO: 1 присоединены глицин-сериновым

линкером. В одном варианте реализации указанные область VL последовательности SEQ ID NO: 21 и область VH последовательности SEQ ID NO: 22 присоединены глицин-сериновым линкером. Согласно еще одному варианту реализации указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот. Согласно еще
 5 одному варианту реализации указанный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер размером 15 аминокислот и содержит (Gly₄Ser)₃. В одном варианте реализации указанный (Gly₄Ser)₃-линкер представляет собой последовательность SEQ ID NO: 23.

В одном варианте реализации указанный scFv присоединен к одному или больше
 10 внутриклеточным сигнальным доменам спейсером. Согласно еще одному варианту реализации scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным доменам спейсером, который содержит константную область иммуноглобулина. В одном варианте реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит что-либо одно или больше из шарнира IgG, CH2-домена IgG и CH3-домена IgG. Согласно конкретному варианту реализации указанная константная область иммуноглобулина
 15 содержит шарнирный домен иммуноглобулина. Согласно еще одному варианту реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит CH3-домен иммуноглобулина. Согласно еще одному варианту реализации указанная константная область иммуноглобулина содержит CH2-домен IgG. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным
 20 доменам спейсером, который содержит CD8α-домен. В одном варианте реализации указанный спейсер присоединен к scFv глицин-сериновым линкером. Согласно еще одному варианту реализации указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот. Согласно еще одному варианту реализации указанный линкер представляет собой глицин-сериновый линкер размером 15 аминокислот и
 25 содержит (Gly₄Ser)₃. В одном варианте реализации указанный (Gly₄Ser)₃-линкер представляет собой последовательность SEQ ID NO: 23. В другом варианте реализации указанные генетически модифицированные Т-клетки сконструированы с дополнительной возможностью экспрессии одной или больше дополнительных биологических молекул.

В одном варианте реализации указанная дополнительная одна или больше молекул
 30 содержит ИЛ-12, и/или SANT7, и/или GAL3C. В одном варианте реализации указанные CAR-Т-клетки экспрессируют одноцепочечный полипептид, содержащий одну субъединицу р35 ИЛ-12 и одну субъединицу р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером. В одном варианте реализации указанные р35 ИЛ-12 и р40 ИЛ-12 соединены
 35 (G₄S)₃-линкером. В одном варианте реализации указанный одноцепочечный полипептид ИЛ-12 образует биоактивный гетеродимер р70 ИЛ-12. В одном варианте реализации указанная CAR-Т-клетка экспрессирует ИЛ-12 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная одна или больше биологических молекул представляет собой SANT7. В одном варианте реализации указанная CAR-Т-клетка экспрессирует SANT7
 40 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанный селективный маркер представляет собой GAL3C. В одном варианте реализации указанная CAR-Т-клетка экспрессирует GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-Т-клетка экспрессирует ИЛ-12, SANT7 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-Т-клетка экспрессирует ИЛ-12, GAL3C и селективный
 45 маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-Т-клетка экспрессирует SANT7, GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанная CAR-Т-клетка экспрессирует ИЛ-12, SANT7, GAL3C и селективный маркер.

[0014] В еще одном варианте реализации указанный способ включает дополнительное

введение пациенту с множественной миеломой, макроглобулинемией Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), амилоидозом или другим В-клеточным злокачественным новообразованием, экспрессирующим КМА, ФРГ-связывающего белка. В одном варианте реализации указанный ФРГ-связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент. В одном варианте реализации экспрессионным вектором, содержащим указанный ФРГ-связывающий белок, котрансфицируют Т-клетку вместе с экспрессионным вектором, кодирующим конструкцию CAR, таким образом, что итоговая CAR-Т-клетка также экспрессирует указанный ФРГ-связывающий белок.

[0015] В другом варианте реализации указанный способ включает введение одного или больше дополнительных биологических или фармацевтических активных агентов. В одном варианте реализации указанный один или больше дополнительных фармацевтически активных агентов представляет собой химиотерапевтический агент. В другом варианте реализации указанный один или больше дополнительных фармацевтически активных агентов представляет собой иммуномодулирующее средство. Согласно конкретному варианту реализации указанное иммуномодулирующее средство представляет собой талидомид или его аналог. Согласно еще одному варианту реализации указанный аналог талидомида представляет собой актимид, леналидомид или помалидомид. Согласно еще одному варианту реализации указанный дополнительный фармацевтически активный агент представляет собой ингибитор гистондеацетилазы. Согласно еще одному варианту реализации указанный ингибитор гистондеацетилазы представляет собой панобиностат, вориностат, трихостатин А, депсипептиды, фенилбутират, вальпроевую кислоту, белиностат, LAQ824, энтиностат, СИ944 или моцетиностат. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше дополнительных биологических или фармацевтически активных агентов вводят до, во время или после лечения указанными генетически модифицированными Т-клетками. Согласно еще одному варианту реализации указанные генетически модифицированные Т-клетки вводят внутривенно. Согласно еще одному варианту реализации указанный генетически модифицированные Т-клетки получены из организма указанного пациента. Согласно еще одному варианту реализации указанные генетически модифицированные Т-клетки не получены из организма указанного пациента.

[0016] В одном варианте реализации указанные CAR-Т-клетки согласно настоящему изобретению вводят до, одновременно с или после аллогенного трансплантата стволовых клеток. Согласно еще одному варианту реализации CAR-Т-клетки согласно настоящему изобретению вводят до, одновременно с или после аллогенного трансплантата стволовых клеток.

[0017] Примеры этих описанных выше аспектов, а также других аспектов настоящего изобретения приведены в иллюстративных примерах вариантов осуществления и применения, некоторые из которых представлены на чертежах и описаны в формуле изобретения ниже. Однако не предполагается, что в приведенном выше кратком описании описаны все проиллюстрированные варианты реализации или всех вариантов осуществления настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0018] Новые признаки настоящего изобретения подробно представлены в прилагаемой формуле изобретения. Для лучшего понимания признаков и преимуществ настоящего изобретения ниже приведено подробное описание, содержащее иллюстративные варианты реализации с применением принципов настоящего изобретения, и сопровождающие чертежи, где:

[0019] На фиг. 1А-1В показана структурная связь CAR и иммуноглобулина (IgG), и Т-клеточного рецептора (TCR). На фиг. 1А показан одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), состоящий из вариабельной области легкой цепи (VL) исходного антитела, соединенной с вариабельной областью тяжелой цепи (VH) полипептидным линкером придает антигенную специфичность указанному CAR. Гибкий шарнир соединяет scFv с трансмембранным и внутриклеточным сигнальным доменом костимулирующей молекулы, такой как CD28, 4-1 BB или OX-40, за которым следует CD3-зета. На фиг. 1В показаны Т-клетки, трансдуцированные CAR, которые активируются при встрече с опухолевыми клетками, несущими целевой антиген (Ag), что приводит к лизису опухолевых клеток.

[0020] На фиг. 2 показаны структурные детерминанты функции химерных антигенных рецепторов.

[0021] На фиг. 3 показана экспрессия КМА на первичных клетках миеломы.

[0022] На фиг. 4А-4С показана функция КМА.CAR-28z. На фиг. 4А представлен проточно-цитометрический анализ экспрессии КМА на клетках различных линий; На фиг. 4В показана экспрессия интерферона-гамма (ИФН- γ) на CD8⁺ Т-клетках, трансдуцированных (верхние графики) и нетрансдуцированных (нижние графики) КМА.CAR-28z. На фиг. 4С показан специфический лизис КМА-положительных и КМА-отрицательных линий клеток трансдуцированными КМА.CAR-28z Т-клетками.

[0023] На фиг. 5А показаны мыши RPMI-Rag, которым инъецировали 5×10^5 - 5×10^6 клеток миеломы. На фиг. 5В показана инфильтрация костного мозга и селезенки CD138⁺ клетками RPMI9226. На фиг. 5С показаны повышенные уровни легкой цепи лямбда в сыворотке человека при прогрессирующем заболевании. На фиг. 5D показаны положительные по CD138⁺/цитоплазматической легкой цепи лямбда клетки в костном мозге. На фиг. 5Е показаны мыши RPMI-Rag в качестве терапевтической модели.

[0024] На фиг. 6А-6С показана оптимизация КМА.CAR. На фиг. 6А показана исходная конструкция КМА.CAR-28z; на фиг. 6В показаны конструкции с шарниром тяжелой цепи Ig и CH3, или только шарниром. На фиг. 6С показаны конструкции, сочетающие оптимальную шарнирную область (opti) с комбинациями различных эндодоменов костимулирующих молекул и CD3-зета.

[0025] На фиг. 7 показаны векторы ИЛ-12 и SANT7.

[0026] На фиг. 8А-8В показано размножение КМ.CAR-Т-клеток и экспрессия CAR для конструкций, описанных в примере 3. На фиг. 8А представлен общий показатель размножения клеток в культурах CAR-Т-клеток с добавлением (слева) и без добавления (справа) клеток КМА-экспрессирующей линии JJN3. Фиг. 8В: экспрессия CAR по оценке с применением GFP в культурах с клетками КМА-экспрессирующей линии JJN3 (верхние графики) и без клеток КМА-экспрессирующей линии JJN3. (нижние графики). hCH2CH3 = Т-клетки КМ.CAR_hCH2CH3_28z; hCH2CH3mut = Т-клетки КМ.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz; h = Т-клетки КМ.CAR_h_28TM_41BBz; CD8a = Т-клетки КМ.CAR_8a_28TM_41BBz.

[0027] На фиг. 9 показана структура индуцируемой активацией транспозонной кассеты. IR = инвертированные повторы; Ins = инсультатор, фланкирующий два конца генной вставки; NFATpro = индуцируемый активацией промотор; BGNrA = сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста; EF1 α = промотор фактора удлинения 1 альфа человека; RQR8 = маркер; SV40 = поздний сигнал полиаденилирования вируса обезьян.

[0028] На фиг. 10 показана экспрессия eGFP под контролем индуцируемого активацией

промотора. Оценивали коэкспрессию RQR8 (ось X) и eGFP (ось Y) на трансдуцированных МКПК, стимулированных ФМА и иономицином (правый график), и сравнивали с нестимулированными контролями (левый график). Трансдуцированные клетки не экспрессируют eGFP в отсутствие стимуляции. 50% трансдуцированных клеток

экспрессировали eGFP при стимуляции.

[0029] На фиг. 11 показана структура индуцируемой активацией транспозонной кассеты с CAR и биологическим средством. IR = инвертированные повторы; Ins = инсультатор, фланкирующий два конца генной вставки; NFATpro = индуцируемый активацией промотор; BGNrA = сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста; EF1 α = промотор фактора удлинения 1 альфа человека; SV40 = поздний сигнал полиаденилирования вируса обезьян.

[0030] На фиг. 12A-12B показаны получение КМА-специфического интерферона-гамма и стандартный анализ на цитотоксичность Т-клеток KM.CAR_hCH2CH3_28z (фиг. 12A) или Т-клеток KM.CAR_h_28TM_41BBz с высвобождением хрома (фиг. 12 B) в линиях КМА+ и КМА- клеток. Используемые КМА-положительные линии клеток включали JJN3, Pfeiffer, NCI-H929, тогда как КМА-отрицательные линии клеток включали Nalm-6 и Molt.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0031] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, соответствующие обычному пониманию среднего специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя на практике для тестирования настоящего изобретения могут применяться любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, предпочтительные материалы и методы описаны в настоящем документе. В описании и формуле настоящего изобретения используются приведенные ниже определения. Следует также понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена не для ограничения, а для описания конкретных вариантов реализации.

[0032] Термины в единственном числе (соотв. артиклям «а» и «ан» в исходном тексте на английском языке) используют в настоящем документе для обозначения одного или больше (т.е. по меньшей мере одного, или одного или больше) объектов, название которого приведено в единственном числе.

[0033] Термин «экспрессионный вектор» в настоящем документе относится к вектору, содержащему рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере одну последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты, которую нужно экспрессировать. Экспрессионный вектор содержит все необходимые цис-действующие элементы, необходимые для экспрессии. Примеры экспрессионных векторов включают, не ограничиваясь перечисленными, плазмиды, космиды и вирусы, кодирующие рекомбинантный полинуклеотид, который нужно экспрессировать. В некоторых вариантах реализации указанный экспрессионный вектор содержит транспозируемые элементы, способные к интеграции в геном, например, экспрессионную систему на основе PiggyBac. В некоторых вариантах реализации указанный экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор, который позволяет осуществлять интеграцию содержимого экспрессионного вектора в геном хозяина, например, ретровирусные и лентивирусные векторы.

[0034] «Химерный антигенный рецептор», или «CAR» означает сконструированный рецептор, который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен. Хотя наиболее распространенный тип CAR

содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), происходящий из моноклонального антитела, слитый с трансмембранным и внутриклеточным доменом Т-клеточного корцептора, например, цепью CD3 ζ , описанное в настоящем документе изобретение не ограничено указанными доменами. Так, в настоящем документе

«химерный антигенный рецептор», или «CAR» относится к любому рецептору, сконструированному для экспрессии внеклеточного антигенсвязывающего домена, слитого или связанного с любой внутриклеточной сигнальной молекулой.

[0035] В настоящем документе термин «CAR-Т-клетка» относится к Т-лимфоциту, генетически сконструированному для экспрессии CAR. Определение CAR-Т-клеток охватывает все классы и подклассы Т-лимфоцитов, в том числе CD4⁺, CD8⁺ Т-клетки, а также эффекторные Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки и т.п. Т-лимфоциты, которые были генетически модифицированы, могут «происходить» или быть «получены» от субъекта, который будет получать лечение с применением указанных генетически модифицированных Т-клеток, или могут «происходить» или быть «получены» от другого субъекта.

[0036] Под «внутриклеточным сигнальным доменом» подразумевается часть CAR, которая находится или сконструирована таким образом, чтобы находиться в Т-клетке. «Внутриклеточный сигнальный домен» может также содержать или не содержать «трансмембранный домен», который заякоривает CAR в плазматической мембране Т-клетки. В одном варианте реализации указанный «трансмембранный домен» и указанный «внутриклеточный сигнальный домен» происходят из одного и того же белка (например, CD3 ζ) в других вариантах реализации; указанный внутриклеточный сигнальный домен и указанный трансмембранный домен происходят из разных белков (например, трансмембранный домен CD3 ζ и внутриклеточный сигнальный домен молекулы CD28, или наоборот).

[0037] Под «костимулирующим эндодоменом» подразумевается внутриклеточный сигнальный домен или его фрагмент, происходящий из Т-клеточной костимулирующей молекулы. Неограничивающий перечень Т-клеточных костимулирующих молекул включает CD3, CD28, OX-40, 4-1BB, CD27, CD270, CD30 и ICOS. Указанный костимулирующий эндодомен может включать или не включать трансмембранный домен того же или другого костимулирующего эндодомена.

[0038] Под «внеклеточным антигенсвязывающим доменом» подразумевается часть CAR, которая специфически распознает и связывает представляющий интерес антиген. Указанный «внеклеточный связывающий домен» может происходить из моноклонального антитела. Например, указанный «внеклеточный связывающий домен» может включать полностью или частично Fab-домен моноклонального антитела. В некоторых вариантах реализации указанный «внеклеточный связывающий домен» включает определяющие комплементарность участки конкретного моноклонального антитела. Согласно еще одному варианту реализации указанный «внеклеточный связывающий домен» представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

[0039] Под «одноцепочечным вариабельным фрагментом», или «scFv» подразумевается гибридный белок из вариабельной области тяжелой (VH) и вариабельной области легкой (VL) цепей антитела с пептидным линкером между указанными VL и VH. Длина и состав линкера варьируют в зависимости от применяемых частей антитела, однако обычно длина составляет от приблизительно 10 до приблизительно 25 аминокислот. В некоторых вариантах реализации указанный пептидный линкер богат глицином, что обеспечивает гибкость. В некоторых вариантах

реализации указанный линкер также включает серин и/или треонин, которые могут, без связи с какой-либо теорией, способствовать растворимости. В некоторых вариантах реализации указанный линкер представляет собой аминокислоту с последовательностью SEQ ID NO: 23. ScFv разрабатывают таким образом, чтобы они сохраняли

5 антигенсвязывающую специфичность исходного антитела, из которого были получены их переменные цепи, несмотря на отсутствие тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации в scFv применяют только определяющие комплементарность участки (участки CDR) VH и VL. В некоторых вариантах реализации используют полные цепи VL и VH.

10 [0040] Термин «антитело» в настоящем документе относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, происходящие из природных источников или рекомбинантных источников и могут представлять собой иммунореактивные части интактных иммуноглобулинов. Антитела согласно настоящему

15 изобретению могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl.

20 Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В настоящем документе термин «антитело» также охватывает фрагменты антитела.

[0041] Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела и относится к определяющим антигены переменным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают, не ограничиваясь перечисленными, Fab-,

25 Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, линейные антитела, scFv-антитела и мультиспецифичные антитела, образованные фрагментами антител.

[0042] «Тяжелая цепь антитела» в настоящем документе относится к большей из полипептидных цепей двух типов, присутствующих во всех молекулах антитела в их встречающихся в природе конформациях.

30 [0043] «Легкая цепь антитела» в настоящем документе относится к меньшей из полипептидных цепей двух типов, присутствующих во всех молекулах антитела в их встречающихся в природе конформациях. Легкие цепи κ и λ относятся к двум основным изотипам легких цепей антител.

[0044] В настоящем документе термин «определяющая комплементарность область»,

35 или «CDR» относится к части двух переменных цепей антител (тяжелые и легкие цепи), которые распознают и связывают конкретный антиген. Участки CDR представляют собой наиболее переменную часть переменных цепей и обеспечивают специфичность антитела. На каждой из переменных областей тяжелых (VH) и переменных областей легких (VL) цепей расположено по три участка CDR, и, соответственно, всего в каждой

40 молекуле антитела присутствует шесть областей CDR.

[0045] Под «КарраМаб» подразумевается моноклональное антитело, ранее называвшееся IST-1097 или MDX-1097. Кроме того, в настоящем документе КарраМаб может относиться к полной последовательности антитела КарраМаб (см., например, патенты США №7344715 и №7556803, каждый из которых включен в настоящий

45 документ полностью посредством ссылки.) Кроме того, термин «КарраМаб» в настоящем документе применяют для обозначения любого полипептида, содержащего последовательности CDR SEQ ID NO: 3-8, и/или последовательность VL из SEQ ID NO: 2 и последовательность VL из SEQ ID NO: 1. Термин «КарраМаб» в настоящем документе

может включать любой полипептид, содержащий последовательность VL из SEQ ID NO: 21 и последовательность VL из SEQ ID NO: 22. В композициях и способах согласно настоящему изобретению КарраMab может включать полное моноклональное антитело или любой его антигенсвязывающий фрагмент, в том числе Fab и scFv.

5 [0046] Термин «антиген», или «Ag» в настоящем документе определен как молекула, которую распознает рецептор иммунной клетки (например, Т-клеточный рецептор, В-клеточный рецептор/иммуноглобулин). В некоторых вариантах реализации антиген представляет собой молекулу, которая вызывает иммунный ответ. В указанный иммунный ответ может быть вовлечен либо синтез антител, либо активация
10 специфических иммунологически компетентных клеток, высвобождение цитотоксических медиаторов, либо иммуностимулирующих или регуляторных цитокинов. Специалисту будет понятно, что антигеном может служить любая макромолекула, в том числе практически все белки или пептиды.

[0047] В настоящем документе термин «специфически связывает» или «специфически
15 распознает» применительно к антителу, фрагменту антитела или CAR относится к антителу, фрагменту антитела или CAR, которое(ый) распознает специфический антиген, но по существу не распознает или не связывает другие молекулы в образце.

[0048] Под «рибосомальным перепрыгиванием» подразумевается альтернативный механизм трансляции, при котором специфический пептид препятствует ковалентному
20 связыванию рибосомы клетки с новой встроенной аминокислотой и вместо этого обеспечивает продолжение трансляции, что, соответственно, приводит к котрансляционному расщеплению полипротеина. Указанный процесс индуцирует элемент «рибосомального перепрыгивания 2А» или цис-действующий гидролазный элемент (например, последовательность CHYSEL). В некоторых вариантах реализации
25 указанная последовательность содержит неконсервативную последовательность аминокислот с выраженной склонностью к образованию альфа-спиралей, за которой следует консенсусная последовательность -D(V/I)ExNPG P, где x = любая аминокислота. Видимое расщепление происходит между G и P. В некоторых вариантах реализации указанный элемент «рибосомального перепрыгивания» представляет собой элемент
30 «рибосомального перепрыгивания» 2А. Указанный элемент «рибосомального перепрыгивания» 2А может представлять собой 5'-элемент «рибосомального перепрыгивания» T2А.

[0049] В настоящем документе «иммуномодулирующее средство» или «IMiD» представляет собой класс лекарственных средств, в который входят талидомид и его
35 аналоги. Аналоги талидомида включают леналидомид, помалидомид и апремиласт.

[0050] В настоящем документе термин «ингибитор гистондеацетилазы», или «ингибитор HDAC», или «HDI» относится к классу соединений, взаимодействующих с функцией гистондеацетилазы. Примеры HDI включают, не ограничиваясь
40 перечисленными: гидроксамовые кислоты, включая, например, трихостатин А, вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), LAQ824, панобиностат (LBH589); циклические трипептиды, в том числе, например, депсипептиды и тайпоксин В; бензамиды, в том числе, например, энтиностат (MS-275), CI994 и моцетиностат (MGCD0103); электрофильные кетоны; и алифатические соединения, такие как например, фенилбутират и вальпроевая кислота.

45 Каппа-антиген миеломы и антитела

[0051] Каппа-антиген миеломы, или КМА, представляет собой антиген клеточной мембраны, присутствующий на поверхности клеток миеломы. Конкретно, КМА состоит из свободных легких цепей каппа, экспрессируемых на клеточной мембране в связанном

нековалентной связью с актином виде (Goodnow et al. (1985) J. Immunol. 135:1276). Хотя в соответствии с настоящим изобретением может применяться любое антитело, которое специфически связывается с КМА, согласно предпочтительному варианту реализации в качестве основы для внеклеточного антигенсвязывающего домена рецепторов CAR согласно настоящему изобретению применяют моноклональное антитело КарраМаб. Моноклональное антитело, обозначаемое как КарраМаб (ранее обозначалось как IST-1097, также известно как MDX-1097) связывается с конформационным эпитопом в области переключения свободной легкой цепи каппа человека, доступным только в тех случаях, когда указанная каппа-цепь не связана с тяжелой цепью, и, соответственно, не связывается с интактными содержащими каппа-цепь IgG, IgM, IgE или IgA (Hutchinson et al. (2011) Mol. Immunol.). На типичную экспрессию КМА на первичных клетках миеломы, происходящих из биоптатов костного мозга пациентов, указывает связывание КарраМаб, показанное на фиг. 3. Антитело КарраМаб может содержать VH-цепь последовательности SEQ ID NO: 1 и VL-цепь последовательности SEQ ID NO: 2. Более конкретно, VH-цепь КарраМаб может содержать участки CDR последовательности SEQ ID NO: 3-5 и участки CDR VL последовательности SEQ ID NO: 6-8. Дополнительно КарраМаб может содержать область VH последовательности SEQ ID NO: 22 и область VL последовательности SEQ ID NO: 21.

Химерные антигенные рецепторы

[0052] Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой искусственные рецепторы, состоящие из связывающих опухолевый антиген областей моноклональных антител и внутриклеточной активирующей части Т-клеточного рецепторного комплекса в составе одной полипептидной цепи, удерживаемых вместе группой линкера(ов) и спейсера(ов) (фиг. 1А-1В). Чаще всего CAR представляют собой гибридные белки из одноцепочечных вариабельных фрагментов (ScFv), слитых с трансмембранным доменом CD3ζ. Однако могут применяться и другие внутриклеточные сигнальные домены, такие как CD28, 41-BB и Oх40, в различных комбинациях, для обеспечения требуемого внутриклеточного сигнала. В некоторых вариантах реализации CAR, предложенные в настоящем изобретении, содержат лидерный пептид тяжелой цепи Ig. Лидерный пептид может быть представлен последовательностью SEQ ID NO: 20.

I. Внеклеточный антигенсвязывающий домен

[0053] В одном варианте реализации CAR согласно настоящему изобретению содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен из моноклонального антитела, специфический в отношении одного или больше эпитопов КМА, экспрессируемых на клетках ММ. В одном варианте реализации CAR согласно настоящему изобретению содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен из КарраМаб. В одном варианте реализации указанный внеклеточный связывающий домен содержит участки CDR VL последовательностей SEQ ID NO: 6-8 и участки CDR VH последовательностей SEQ ID NO: 3-5. Согласно конкретному варианту реализации указанный внеклеточный связывающий домен представляет собой scFv, содержащий домены VL (SEQ ID NO: 2) и VH (SEQ ID NO: 1) КарраМаб. В другом варианте реализации указанный внеклеточный связывающий домен представляет собой scFv, содержащий домены VL (SEQ ID NO: 21) и VH (SEQ ID NO: 22) КарраМаб.

II. Линкер между доменами VL и VH scFv КарраМаб

[0054] В еще одном варианте реализации домен VL КарраМаб соединен с доменом VH КарраМаб гибким линкером. В частности, указанный гибкий линкер представляет собой глицин-сериновый линкер из приблизительно 10-30 аминокислот (например, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислот) и содержит

структуру (Gly₄Ser)₃. Согласно конкретному варианту реализации указанный линкер имеет длину 15 аминокислот. Длина линкера представляет собой важную характеристику CAR. Без определенного теоретического обоснования, более короткие линкеры могут повышать аффинность, однако могут также приводить к образованию внутриклеточных мультимеров, соответственно, нарушая экспрессию CAR; тогда как более длинные линкеры демонстрируют тенденцию к снижению аффинности в отношении антигена за счет большего пространственного отдаления областей CDR VL и VH.

III. Спейсеры между внеклеточным антигенсвязывающим доменом и внутриклеточным сигнальным доменом

[0055] Внеклеточный антигенсвязывающий домен (например, scFv КарпаМаб) соединяют с внутриклеточным сигнальным доменом при помощи «спейсера». Указанный спейсер разработан таким образом, чтобы обладать достаточной гибкостью, обеспечивающей ориентацию антигенсвязывающего домена, облегчающую распознавание и связывание антигена. Указанный спейсер может происходить из собственно иммуноглобулинов и включать шарнирную область IgG1 или область CH2 и/или CH3 IgG. Как вариант, шарнир может содержать, полностью или частично, цепь CD8α. Длина и гибкость спейсера(ов) зависят как от распознающего антиген домена, так и от внутриклеточных связывающих областей; то, что может быть функциональным и/или оптимальным для одной конструкции CAR, может не подходить для другого CAR. В определенных случаях спейсер может быть обозначен в настоящем документе как «opti» (см. фиг. 6А-6С), что означает, что оптимальные характеристики и длина спейсера варьируют в зависимости от применяемой внеклеточной связывающей части и выбранных внутриклеточных сигнальных доменов. Согласно определенному варианту реализации применяют отдельно шарнир IgG. Согласно другим вариантам реализации указанный шарнир IgG применяют совместно с полным CH2-доменом IgG или его частью. Согласно другим вариантам реализации указанный шарнир IgG применяют совместно с полным CH3-доменом IgG или его частью. Согласно другим вариантам реализации шарнир IgG применяют совместно с полными CH2- и CH3-доменами IgG или их частями. Согласно другим вариантам реализации применяют CH2-домен IgG полностью или частично. Согласно другим вариантам реализации применяют CH3-домен IgG полностью или частично. Согласно дополнительным вариантам реализации применяют и CH2-, и CH3-домен IgG, полностью или частично. В одном варианте реализации шарнир, CH2- и CH3-домены, применяемые в любых предложенных в настоящем изобретении конструкциях, содержат мутацию С→Р в шарнирной области в положении аминокислоты 103 согласно Uniprot P01857). В одном варианте реализации шарнир, CH2- и CH3-домены, применяемые в любых предложенных в настоящем изобретении конструкциях, представлены последовательностью SEQ ID NO: 24. В другом варианте реализации указанный шарнир применяют совместно с полными CH2- и CH3-доменами IgG или их частями, причем вводят мутации аминокислот в положениях, важных для взаимодействия CH2 с Fc-рецепторами. Указанные мутации могут опосредовать повышенную выживаемость после инфузии за счет уменьшения взаимодействия Fc с CAR-Т-клетками, предложенными в настоящем изобретении. Примером указанных мутаций может быть конструкция KM.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz, представленная в примере 3 в настоящем документе. В еще одном дополнительном варианте реализации применяют полипептид CD8α. В еще одном варианте реализации спейсер (например, происходящий из доменов иммуноглобулина согласно описанию в настоящем документе) может быть присоединен к scFV гибким линкером. В частности, указанный гибкий линкер представляет собой

глицин-сериновый линкер из приблизительно 10-30 аминокислот (например, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислот) и содержит структуру (Gly₄Ser)₃.

IV. Внутриклеточный сигнальный домен

[0056] Внутриклеточный сигнальный домен содержит полностью или частично цепь CD3 ζ . CD3 ζ также известная как CD247, совместно Т-клеточным корецептором либо с CD4 или CD8 отвечает за сопряжение внеклеточного распознавания антигена с внутриклеточными сигнальными каскадами. В одном варианте реализации CD3 ζ , применяемый в любых предложенных в настоящем изобретении конструкциях, представлен последовательностью SEQ ID NO: 26.

[0057] В дополнение к включению сигнального домена CD3 ζ , включение костимулирующих молекул, как было показано, усиливает активность CAR-Т-клеток в моделях на мышах и в клинических испытаниях. Было исследовано несколько молекул, в том числе CD28, 4-1BB, ICOS, CD27, CD270, CD30 и OX-40. CAR согласно настоящему изобретению содержат также, помимо scFv КарпаМаб, гибкого линкера, оптимального шарнира и цепи CD3 ζ , один или больше дополнительных костимулирующих доменов, например, из CD28, 4-1BB, ICOS, CD27, CD270, CD30 и/или OX-40. Указанные костимулирующие домены выбирают на основании требуемой функциональности итоговой CAR-Т-клетки. Примеры комбинаций показаны, например, на фиг. 6А-6С. Помимо изменения длины внеклеточного шарнира, включение конкретных комбинаций костимулирующих доменов (например, CD28, OX-40, 4-1BB) также повышает пролиферацию и выживаемость CAR-Т-клеток *in vivo*. В одном варианте реализации применяемый в любых предложенных в настоящем изобретении конструкциях домен CD28 представлен последовательностью SEQ ID NO: 25.

Коэкспрессия биологически активных молекул

[0058] CAR-Т-клетки согласно настоящему изобретению имеют дополнительное преимущество по сравнению с применением только КарпаМаб, так как они могут быть дополнительно модифицированы для включения дополнительных биологически активных молекул, усиливающих противоопухолевую функцию и/или повышающих безопасность композиций. В одном варианте реализации указанные CAR-Т-клетки могут быть дополнительно генетически модифицированы для продуцирования противоопухолевых цитокинов, обеспечивающих целенаправленную доставку в микроокружение опухоли/раковые клетки, позволяя при этом избежать системной токсичности. Примеры дополнительных биологически активных молекул, которые могут усиливать противоопухолевый ответ CAR-Т-клеток согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения, ИЛ-12, углевод-связывающий белок галектин-3 (GAL3) или его усеченную форму, GAL3С, и супер-антагонист цитокиновых рецепторов SANT7. В другом варианте реализации CAR-Т-клетки согласно настоящему изобретению могут также быть котрансдуцированы плазмидой, которая экспрессирует связывающий фактор роста гепатоцитов (ФРГ) белок. В одном варианте реализации указанный связывающий фактор роста гепатоцитов белок представляет собой антитело или его фрагмент, которое(ый) способен связывать и ингибировать функцию ФРГ.

[0059] ИЛ-12 представляет собой мощный подавляющий рост опухоли цитокин, уменьшающий рост опухоли и ангиогенез и усиливающий опухолеспецифичный иммунный ответ. В клетках множественной миеломы сохраняется экспрессия рецептора ИЛ-12; у мышей - носителей миеломы ИЛ-12 снижает прогрессирование опухоли при введении в виде монотерапии и действует синергистически при введении с ингибитором протеасомы бортезомибом (Airoldi, et al. (2008) Blood, 112(3):750-759; Wang, et al. (2014)

Anticancer Drugs, 25(3): 282-288). Экспрессия ИЛ-12 CAR-T-клетками значительно повышает их способность к эрадикации солидных опухолей, однако указанный способ еще не был исследован при множественной миеломе (Pegram, (2012) Blood, 119(180):4133-4141 и Zhang, et al. (2011) Mol. Ther. 19(4):751-759).

5 [0060] SANT7 представляет собой супер-антагонист цитокинового рецептора. Он представляет собой аналог ИЛ-6, который был генетически модифицирован с обеспечением 70-кратного усиления связывания с α -субъединицей рецептора ИЛ-6, при практически полном отсутствии взаимодействия с сигнальной субъединицей gp130. SANT7 индуцирует апоптоз в клетках ИЛ-6-зависимых линий миеломы *in-vitro*, устраняет
10 опосредованную стромой устойчивость к дексаметазону *in-vitro* и в модели на мышах, а в комбинации с ингибиторами NF κ B, полностью устраняет устойчивость к апоптозу. ИЛ-6 представляет собой цитокин, имеющий значение для роста и выживаемости различных опухолей, в том числе множественной миеломы, рака легкого, рака ободочной и прямой кишки, рака молочной железы и других. Связывание ИЛ-6 с
15 соответствующим рецептором активирует путь JAK-STAT, с последующим фосфорилированием STAT3, который модулирует экспрессию связанных с апоптозом генов, таких как BCL-XL и p53, вызывающую устойчивость к апоптозу. ИЛ-6 также способствует понижающей регуляции рецептора ИЛ-12 на клетках миеломы, что уменьшает подавляющие опухолевый рост свойства ИЛ-12. (Airolidi, et al. (2008) Blood,
20 112(3):750-759). При миеломе наблюдается повышающая регуляция рецептора ИЛ-6, а повышенные системные уровни ИЛ-6 коррелируют с неблагоприятным прогнозом. (Rawstron, et al. (2000) Blood 96(12) 3880-3886; Ludwig, et al. (1991) Blood, 77(12):2794-2795). Были разработаны моноклональные антитела к ИЛ-6 для клинического применения, однако, хотя в ранних клинических испытаниях при миеломе были продемонстрированы
25 измеряемые биологические эффекты, указанные антитела, как оказалось, образуют комплексы с циркулирующим ИЛ-6, что приводит к снижению выведения и потенциально ограничивает их эффективность. (Bataille, et al. (1995) Blood, 86(2): 685-691). Недавно проводилась оценка гибридного ИЛ-6-специфического моноклонального антитела силтуксимаб в клинических испытаниях фазы I и II при рецидивирующей и рефрактерной
30 множественной миеломы. Ответ на собственно силтуксимаб отсутствовал, однако была распространена гематологическая токсичность, при этом более чем в половине случаев наблюдались связанные с терапией инфекции.

[0061] Галектин-3 представляет собой углевод-связывающий белок, который может играть роль в адгезии и инвазии опухоли. Усеченная форма галектина-3, Gal3C, действует
35 доминантно-негативным образом и может ингибировать рост и инвазию клеток миеломы. Конструкция Gal3C для индуцируемой активацией секреции была разработана на основе источников: John et al (2003) Clin Cancer Res., 9(6):2374-83 и Mirandola et al. (2011) PLoS One, 6(7):e21811. Она состоит из карбоксильного конца длиной 143 аминокислот, сохраняющего углевод-связывающие свойства, однако не содержащего
40 N-концевые аминокислоты, необходимые для перекрестного связывания лиганда. Указанная конструкция также содержит лидерный пептид CD8-альфа для направления секреции и 6xHis-метку для детекции.

[0062] В некоторых вариантах реализации помимо экспрессионных векторов, содержащих конструкцию CAR, описанную выше, Т-клетки дополнительно
45 модифицировали одним или больше экспрессионными векторами, содержащими ИЛ-12, SANT7 и/или GAL3C. Например, экспрессионные конструкции, экспрессирующие одноцепочечный ИЛ-12, содержащий субъединицу p35 ИЛ-12, связанную с субъединицей p40 ИЛ-12, в частности, подходят для применения, поскольку итоговый белок

представляет собой полностью биоактивный гетеродимер р70 ИЛ-12, однако экспрессируемый в виде единого полипептида. В одном варианте реализации применяют одноцепочечную конструкцию ИЛ-12, называемую Flexi-12 и описанную, например, в источнике: Anderson, et al. (1997) Hum. Gene Ther. 8(9):1125-35. Одноцепочечная конструкция ИЛ-12 может быть экспрессирована в составе того же экспрессионного вектора, что и конструкция CAR, или может быть экспрессирована в отдельном экспрессионном векторе и котрансдуцирована в Т-клетку. Аналогичным образом, Т-клетки, трансдуцированные описанной выше конструкцией CAR, могут быть котрансдуцированы дополнительным экспрессионным вектором, содержащим SANT7 и/или GAL3C. Как вариант, один экспрессионный вектор может применяться для трансдуцирования Т-клеток как SANT7, так и GAL3C, по отдельности или в комбинации, и описанной выше конструкцией CAR. В другом варианте реализации могут применяться три экспрессионных вектора, один из которых экспрессирует конструкцию CAR, другой экспрессирует одноцепочечную конструкцию ИЛ-12, а третий экспрессирует конструкцию SANT7. Аналогичная стратегия может применяться для коэкспрессии GAL3C с ИЛ-12 и/или SANT7. Как вариант, конструкция ИЛ-12, GAL3C и/или SANT7 может быть экспрессирована с помощью одного экспрессионного вектора, а конструкция CAR - с помощью собственного экспрессионного вектора. Специалисту в данной области техники известны и другие комбинации и возможности экспрессирования указанных молекул в одной Т-клетке.

ФРГ-связывающий белок

[0063] Была показана вовлеченность фактора роста гепатоцитов (ФРГ) и его рецептора MET в развитие и прогрессирование раковых заболеваний, в частности, в инвазию опухолей и прогрессирование до метастатического заболевания. Клетки множественной миеломы экспрессируют и ФРГ, и MET, что, соответственно, приводит к образованию как аутокринной, так и паракринной петли, тогда как нормальные плазматические клетки не экспрессируют ФРГ (Zhan et al. (2002); Borset, et al. (1996). Кроме того, концентрации ФРГ значительно повышены в плазматических клетках крови и костного мозга пациентов с множественной миеломой; высокие уровни ФРГ в сыворотке коррелируют с распространенной стадией заболевания и обширным поражением костей (Seidel et al. (1998); Wader, et al. (2008); Alexandrakis, et al. (2003). Кроме того, анализ биомаркеров сыворотки пациентов в ходе фазы I испытания КарраМаб демонстрирует статистически значимое дозозависимое снижение уровней ФРГ в сыворотке после лечения КарраМаб по сравнению с контролем. Для усиления указанного снижения уровней ФРГ сыворотки, согласно определенным вариантам реализации, ФРГ-связывающий белок экспрессируют в CAR-Т-клетках согласно настоящему изобретению. Согласно конкретному варианту реализации экспрессируемый ФРГ-связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент. Согласно конкретному варианту реализации указанный связывающий анти-ФРГ белок представляет собой антитело, диатело, scFv или Fab. В одном варианте реализации указанный ФРГ-связывающий белок экспрессируют в составе того же экспрессионного вектора, что и конструкцию CAR. В еще одном варианте реализации указанный ФРГ-связывающий белок экспрессируют в составе отдельного экспрессионного вектора, однако котрансдуцируют вместе с конструкцией CAR. В еще одном дополнительном варианте реализации CAR-Т-клетка экспрессирует CAR, ФРГ-связывающий белок и ИЛ-12. В еще одном дополнительном варианте реализации CAR-Т-клетка экспрессирует CAR, ФРГ-связывающий белок и SANT7. В еще одном дополнительном варианте реализации CAR-Т-клетка экспрессирует CAR, ФРГ-связывающий белок и GAL3C. В

еще одном дополнительном варианте реализации CAR-T-клетка экспрессирует CAR, ФРГ-связывающий белок, ИЛ-12 и GAL3C. В еще одном дополнительном варианте реализации CAR-T-клетка экспрессирует CAR, ФРГ-связывающий белок и SANT7 и GAL3C. Согласно еще одному варианту реализации CAR-T-клетка экспрессирует CAR, связывающий анти-ФРГ белок, ИЛ-12 и SANT7. В еще одном дополнительном варианте реализации CAR-T-клетка экспрессирует CAR, ФРГ-связывающий белок, ИЛ-12, SANT7 и GAL3C.

Способы получения CAR-T-клеток согласно настоящему изобретению

[0064] Согласно одному аспекту предложены способы получения CAR-T-клеток, экспрессирующие рецептор(ы) CAR, описанные в настоящем документе, и необязательно один или больше противоопухолевых цитокинов (например, ИЛ-12 и/или SANT7), и/или один или больше ФРГ-связывающих белков. Специалисту в данной области техники будет хорошо понятно, что, хотя в настоящем документе описаны предпочтительные способы конструирования экспрессионных векторов, содержащих указанные CAR и противоопухолевые цитокины/антитела согласно настоящему изобретению, могут применяться любые способы, способные обеспечивать трансдукцию Т-клеток для экспрессии указанных компонентов.

[0065] В одном варианте реализации Т-клетки получают из крови субъекта путем венепункции, аспирации костного мозга, равновесного лейкофереза или лейкофереза с примириванием цитокинами и последующего выделения моноклеарных клеток периферической крови, в том числе Т-клеток, с применением разделения в градиенте плотности. В некоторых вариантах реализации после лизирования красных клеток крови Т-клетки сортируют с помощью проточной цитометрии или очищают с применением антител к антигенам, экспрессируемым на Т-клетках, и магнитных гранул для получения популяции чистых Т-клеток. Согласно конкретному варианту реализации Т-клетки сортируют на основании экспрессии ими CD3 с получением фракции цельных Т-клеток. В другом варианте реализации Т-клетки сортируют на основании экспрессии ими CD4 или CD8 с получением популяции CD4⁺ Т-клеток или CD8⁺ Т-клеток. Согласно конкретному варианту реализации Т-клетки получают от субъекта, нуждающегося терапии CAR-T-клетками. В другом варианте реализации Т-клетки получают от субъекта-донора, не являющегося предполагаемым реципиентом терапии CAR-T-клетками.

[0066] В одном варианте реализации отделенные Т-клетки культивируют *in vivo* в условиях, подходящих для их выживания, и трансдуцируют экспрессионными векторами, содержащими последовательности, необходимые для экспрессии CAR, описанных в настоящем документе, и/или ИЛ-12, SANT7, GAL3C и/или ФРГ-связывающего белка. В одном варианте реализации указанный экспрессионный вектор представляет собой экспрессионную систему на основе транспозируемого вектора. Согласно конкретному варианту реализации указанный экспрессионный вектор представляет собой экспрессионную плазмиду с транспозоном PiggyBac или вирусный вектор (например, ретровирусный вектор или лентивирусный вектор). В одном варианте реализации указанная экспрессионная плазида с транспозоном PiggyBac является индуцируемой, такой как, например, плазида с транспозоном PiggyBac, описанная в примерах в настоящем документе. В одном варианте реализации указанная экспрессионная плазида с транспозоном PiggyBac содержит конститутивно активный промотор и/или индуцируемый активацией промотор. Указанный конститутивно активный промотор может представлять собой промотор фактора удлинения 1 альфа (EF1_{альфа}). Указанный индуцируемый активацией промотор может представлять собой промотор (NFAT pro). Согласно одному аспекту применяют экспрессионную плазмиду с PiggyBac,

обеспечивающую стойкую интеграцию CAR за счет вырезания и вставки кодирующих последовательностей CAR, ИЛ-12, SANT-7, GAL3C и/или ФРГ-связывающего белка в геном Т-клетки. Согласно конкретному варианту реализации экспрессионные векторы согласно настоящему изобретению дополнительно содержат детектируемый маркер, позволяющий идентифицировать Т-клетки, которые были успешно трансдуцированы указанным одним или больше экспрессионными векторами. В одном варианте реализации указанный детектируемый маркер выбирают из группы, состоящей из маркера клеточной поверхности, такого как CD34 или CD20, или другого поверхностного белка, флуорофора, такого как флуоресцеин-изотиоцианат, или любого другого флуоресцентного красителя, испускающего свет при возбуждении с переходом в более высокое энергетическое состояние, в том числе с применением лазера, и кассеты устойчивости к антибиотику, например, устойчивости к канамицину, устойчивости к ампициллину или любой другой кассеты, которая придает устойчивость к веществу-антибиотику, содержащемуся в среде, в которой предполагается культивировать трансдуцированные Т-клетки. В одном варианте реализации указанный детектируемый маркер представляет собой зеленый флуоресцентный белок (GFP). GFP может представлять собой усиленный GFP, такой как, например, в конструкциях, представленных в примерах в настоящем документе. Согласно конкретному варианту реализации каждый из применяемых экспрессионных векторов (например, один экспрессионный вектор, содержащий CAR; один, содержащий ИЛ-12, GAL3C и/или SANT-7; и один, содержащий ФРГ-связывающий белок) содержит уникальный детектируемый маркер. В одном варианте реализации указанные экспрессионные векторы трансдуцируют в Т-клетку способом, подходящим для выбранного(ых) экспрессионного(ых) вектора(ов). В одном варианте реализации указанный экспрессионный вектор с PiggyBac трансдуцируют в Т-клетки путем электропорации.

[0067] После введения подходящих экспрессионных векторов Т-клетки могут быть культивированы и размножены *in vitro* путем совместного культивирования с аутологичными моноклеарными клетками периферической крови (МКПК) и подходящими факторами роста; затем проводят их скрининг на присутствие одного или больше детектируемых маркеров. Т-клетки, экспрессирующие надлежащие детектируемые маркеры выбранных экспрессионных векторов, могут затем быть отсортированы и очищены для применения в способах согласно настоящему изобретению.

Способы лечения КМА-экспрессирующих злокачественных новообразований

[0068] Согласно одному аспекту предложены способы лечения нуждающихся в этом субъектов CAR-Т-клетками согласно настоящему изобретению. Согласно конкретному аспекту нуждающийся в этом субъект представляет собой субъекта-человека, у которого было диагностировано или предположительно имеется злокачественное новообразование, экспрессирующее КМА, например, В-клеточное злокачественное новообразование, экспрессирующее КМА. В некоторых вариантах реализации пациент страдает или предположительно страдает множественной миеломой (ММ), макроглобулинемией Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) или амилоидозом. Способы диагностики В-клеточных злокачественных новообразований, экспрессирующих КМА, например, множественной миеломы (ММ), макроглобулинемии Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) и амилоидоза известны в данной области техники, и поэтому подробно не описаны в настоящем документе. Указанные CAR-Т-клетки могут применяться по отдельности или в комбинации с другими терапевтически эффективными агентами для лечения

множественной миеломы (ММ), макроглобулинемии Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), амилоидоза или другого В-клеточного злокачественного новообразования, экспрессирующего КМА. В некоторых аспектах CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению вводят в фармацевтический состав, подходящий для внутривенной доставки.

[0069] В некоторых аспектах CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению вводят до, во время или после одного или больше иммуномодулирующих лекарственных средств. Согласно конкретному аспекту указанное одно или больше иммуномодулирующих лекарственных средств представляет собой талидомид или аналог талидомида, такой как, например, леналидомид или помалидомид.

[0070] В некоторых аспектах настоящего изобретения CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению действуют синергистически при введении с одним или больше иммуномодулирующих лекарственных средств.

[0071] В еще одном варианте реализации CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению вводят до, во время или после лечения одним или больше ингибиторов гистондеацетилазы, таким(и) как панобиностат, вориностат, трихостатин А, депсипептиды, фенилбутират, вальпроевая кислота, белиностат, LAQ824, энтиностат, CI944 или моцетиностат.

[0072] В некоторых аспектах настоящего изобретения CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению действуют синергистически при введении в комбинации с одним или больше ингибиторов гистондеацетилазы.

[0073] В некоторых аспектах настоящего изобретения CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению действуют синергистически при введении в комбинации с химиотерапией с промежуточными или высокими дозами и после введения аутологичных или аллогенных стволовых клеток крови человека.

[0074] В одном варианте реализации CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению вводят до, одновременно с или после аллогенного трансплантата стволовых клеток. Согласно еще одному варианту реализации CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению вводят до, одновременно с или после аллогенного трансплантата стволовых клеток. Без связи с какой-либо теорией, CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению при введении в комбинации с аутологичным или аллогенным трансплантатом стволовых клеток предотвращают появление минимального остаточного заболевания, которое может возникать при неполной абляции костного мозга перед трансплантацией стволовых клеток или при повторном появлении злокачественных клонов В-клеток, экспрессирующих КМА.

[0075] Все цитируемые в настоящем документе патенты, заявки на патент и публикации включены посредством ссылки явным образом и полностью для любых целей.

ПРИМЕРЫ

[0076] Настоящее изобретение дополнительно подробно описано на представленных ниже экспериментальных примерах. Указанные примеры предложены исключительно с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения, если не указано иное. Соответственно, настоящее изобретение никоим образом не должно толковаться как ограниченное приведенными ниже примерами; напротив, оно охватывает любые возможные варианты, ставшие очевидными в свете принципов, изложенных в настоящем документе.

[0077] Без дополнительного описания, считается, что специалист в данной области техники сможет с применением предшествующего описания и приведенных ниже

примеров получить и использовать соединения согласно настоящему изобретению и реализовать на практике заявленные способы. Соответственно, приведенные ниже демонстрационные примеры, в частности, указывают на предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения и не должны истолковываться как ограничивающие

5 каким-либо образом остальную часть настоящего описания.

ПРИМЕР 1: получение KMA.CAR-28z

[0078] На основе последовательности нуклеотидов, кодирующей вариabельные области KappaMab (SEQ ID NO: 9 и 10), был разработан scFv и клонирован в конструкцию CAR, содержащую шарнир тяжелой цепи иммуноглобулина, костимулирующий домен CD28 и эндодомен CD3-зета (фиг. 6A). Указанная конструкция была разработана в Clone Manage 9 (Sci-Ed Software) с применением генетической последовательности вариabельных областей антитела, поставляемого Naemalogix Pty Ltd. Последовательности аминокислот в направлении от 5' к 3' частей указанной конструкции (т.е. KM.CAR-hCH2CH3-28z; фиг. 6A) приведены ниже:

15 [0079] Лидерный пептид тяжелой цепи Ig (Uniprot P01764): MEFGLSWFLVAILKGVQCSR (SEQ ID NO: 20).

[0080] Вариabельная область легкой цепи антитела KappaMab: DIVMTQSQKFMSTS VGDRVSVTCASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSTSYRYSQVGPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 21).

20 [0081] Вариabельная область тяжелой цепи: EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGF NIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQKGKATIIADTSSNTAYLQLSSL TSEDTAVYYCARGVYHDYDGDYWGQGTTLTVSSYVTVSS (SEQ ID NO: 22).

[0082] Гибкий (G4S)₃-линкер: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23).

25 [0083] Шарнир, CH2- и CH3-домены константной области IgG1 с мутацией C>P в шарнирной области в положении аминокислоты 103 (Uniprot P01857): YVTVSSQDPAE PKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK

30 (SEQ ID NO: 24).

[0084] Трансмембранный и внутриклеточный домены CD28 (Uniprot P10747): FWVL VVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRS (SEQ ID NO: 25).

35 [0085] Внутриклеточный домен CD3-зета человека (Uniprot P20693): RVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 26).

[0086] Полноразмерная последовательность аминокислот имеет следующую последовательность: MEFGLSWFLVAILKGVQCSRDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC KASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSTSYRYSQVGPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVKPGASV KLSCASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQKGKATIIADTSSN TAYLQLSSLTSEDTAVYYCARGVYHDYDGDYWGQGTTLTVSSYVTVSSQDPAEPKSPD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVL VVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR

KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR (SEQ ID NO: 27).

[0087] Указанную последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 27) кодирует следующая последовательность ДНК:

5 [0088] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTA
GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATGTAGC
CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGACATCCTA
CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
10 CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAAT
ATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
GTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
CTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
15 GGCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
GTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
CTCCTACGTCACCGTCTCTTCACAGGATCCCGCCGAGCCCAATCTCCTGACAAAAC
20 TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT
CTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
25 AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAATA
CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
30 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
AAAGATCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGC
TTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC
CTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCA
35 TTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCGAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT
CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACG
AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG
GACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG
40 CGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA
CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:
28).

[0089] Для конструирования указанной конструкции с использованием сервиса GeneArt (ThermoFisher Scientific) синтезировали генную последовательность, состоящую
45 из 5'-сайта рестрикции фермента EcoRI, 5'-последовательности Kozak, лидерного пептида, одноцепочечного варибельного фрагмента и части константной области IgG1, в которую входит сайт рестрикции фермента AleI, верифицировали последовательность и затем клонировали в экспрессионную плазмиду pIRII-CAR.CD19-28z с транспозоном

PiggyBac. Затем ее вводили в донорные Т-клетки от 2 нормальных доноров путем совместной электропорации с транспозазной плазмидой для PiggyBac, опосредующей стабильную интеграцию. Транспозон/транспозазная система PiggyBac обеспечивает стойкую интеграцию CAR за счет вырезания и вставки представляющего интерес гена в геном целевой клетки. Экспрессионная система на основе PiggyBac была выбрана ввиду ее способности обеспечивать стойкую генетическую модификацию на выраженном уровне при значительно более низкой стоимости, чем для ретровирусных векторов. При этом специалисту в данной области техники будет понятно, что в соответствии с настоящим изобретением могут также применяться другие экспрессионные системы, включая ретровирусные векторы.

[0090] Экспрессирующие KM.CAR-hCH2CH3-28z Т-клетки размножали в соответствии с оптимизированными протоколами авторов изобретения путем совместного культивирования с аутологичными питающими клетками - моноклеарными клетками периферической крови (МКПК) с добавлением 10 нг/мл интерлейкина-15 (ИЛ-15). После культивирования на протяжении 3 недель с еженедельной заменой МКПК и восполнением ИЛ-15 2-3 раза в неделю, Т-клетки собирали, оценивали их фенотип и экспрессию CAR с помощью проточной цитометрии, КМА-специфическую функцию путем проточно-цитометрического анализа на внутриклеточный цитокин интерферон-гамма при стимуляции клетками КМА⁺ и КМА⁻-линий (фиг. 4А); и цитотоксичность этих линий клеток в анализе с высвобождением хрома.

[0091] В конце 3-недельного периода культуры состояли в основном из CAR-экспрессирующих CD3⁺ Т-клеток (55% и 70% живых клеток), экспрессировали интерферон-гамма в ответ на КМА⁺ клетки миеломы и В-линий (фиг. 4В), и демонстрировали КМА-специфическую цитотоксичность (фиг. 4С).

Пример 2: получение модели ксенотрансплантата миеломы человека на мышах
[0092] Получали модель миеломы человека на основе ксенотрансплантата множественной миеломы у мышей. Клетки RPMI8226 или альтернативных линий миеломы инокулировали в/в мышам Rag2^{-/-}γс^{-/-} (BALB/c) для получения модели Rag MM (фиг. 5А-5D). У мышей Rag2^{-/-}γс^{-/-} (BALB/c) отсутствуют лимфоциты мышей (Т, В и НК-клетки), и они представляют собой восприимчивых хозяев для исследования ксенотрансплантатов человека. Указанную модель успешно применяли для тестирования новых терапевтических средств, таких как бортезомиб, в комбинации с новым антителом (фиг. 5Е). Авторы настоящего изобретения применяют указанную модель MM для тестирования и дополнительной оптимизации КМА.CAR-Т-клеток.

Пример 3: оптимизированные конструкции КМА.CAR

[0093] На основе конструкции, описанной в примере 1, конструировали 6 конструкций CAR, содержащих scFv KM, описанный в примере 1, с областями спейсеров переменной длины и костимулирующими эндодоменами (например, CD28 или 4-1BB (CD137-Uniport Q07011)), с эндодоменом CD3-зета (фиг. 2 и фиг. 6В-6D). С помощью спейсера варьирующей длины изменяли расстояние между Т-клеткой и целевой клеткой, при этом более короткий спейсер потенциально усиливал лизис целевых клеток. Во всех конструкциях применяли трансмембранный домен CD28 для обеспечения стабильной экспрессии рецепторов КМА.CAR на поверхности Т-клеток. Во всех случаях, когда в качестве спейсера применяли компоненты константной области тяжелой цепи IgG1, между scFv и спейсерной областью размещали второй гибкий (G4S)₃-линкер. Указанные CAR синтезировали с использованием коммерческого сервиса Genscript и клонировали в плазмиду pVAX1PB с транспозоном PiggyBac для дальнейшего тестирования.

[0094] 3 из 6 конструкций KM.CAR содержали костимулирующий эндодомен CD28; они представлены ниже:

[0095] Первая конструкция указанной группы была представлена конструкцией KM.CAR_hCH3_28z, которая содержит только шарнирный и CH3-домены константной области тяжелой цепи IgG1 в качестве спейсера и имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

[0096] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTA
GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATGTAGC
CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGACATCCTA
CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTTCAGCAAT
ATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
GTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
CTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
GTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
CTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAGGTTCAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCA
AATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGC
TTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC
CTGCACAGTGAATACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCA
TTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT
CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACG
AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG
GACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG
CGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA
CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:
29).

[0097] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 29) содержит лидерный пептид, вариабельную область легкой цепи КарраМаб, (G4S)₃-линкер, вариабельную область тяжелой цепи КарраМаб, второй (G4S)₃-линкер, шарнирный домен & домен CH3 константной области IgG1, трансмембранный и внутриклеточный домены CD28 и внутриклеточный домен CD3-зета. Диаграмма указанной конструкции приведена на фиг. 6В.

[0098] Вторая конструкция указанной группы представлена конструкцией KM.CAR_h_28z, которая содержит только шарнирный домен константной области тяжелой цепи IgG1 в качестве спейсера, и имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

[0099] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTA
 GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATGTAGC
 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGACATCCTA
 5 CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
 CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAAT
 ATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
 GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTTCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
 GTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
 10 CTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
 GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
 GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
 TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
 GTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
 15 CTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAGGTTCAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCA
 AATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAG
 TCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGA
 GTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGAACATGACTCCCCGCCGCCCC
 GGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTA
 20 TCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC
 AGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
 GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG
 TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTAC
 25 CAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCT
 GCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 30).

[00100] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 30) содержит
 лидерный пептид, варибельную область легкой цепи КарраМаб, (G4S)₃-линкер,
 варибельную область тяжелой цепи КарраМаб, второй (G4S)₃-линкер, шарнирный
 30 домен константной области IgG1, трансмембранный и внутриклеточный домены CD28
 и внутриклеточный домен CD3-зета. Диаграмма указанной конструкции приведена на
 фиг. 6В.

[00101] Третья конструкция указанной группы была представлена конструкцией
 35 KM.CAR_CD8a_28z, которая содержит «стебель» CD8-альфа (Uniprot P01732,
 аминокислоты 138-182) в качестве спейсера, и имеет следующую последовательность
 нуклеиновой кислоты:

[00102] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTA
 40 GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATGTAGC
 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGACATCCTA
 CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
 CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAAT
 ATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
 45 GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTTCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
 GTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
 CTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
 GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
 GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC

TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
 GTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
 CTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTTCG
AGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGAC
 5 ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTC
 CTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGT
 AAGAGGAGCAGGCTCCTGACAGTGAACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGG
 GCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCGAGCCTATCG
 CTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA
 10 ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTC
AGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAG
GGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC
 15 CCCTCGC (SEQ ID NO: 31).

[00103] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 31) содержит лидерный пептид, вариабельную область легкой цепи КарраМаб, (G4S)₃-линкер, вариабельную область тяжелой цепи КарраМаб, «стебель» CD8-альфа, трансмембранный и внутриклеточный домены CD28, и внутриклеточный домен CD3-зета.

20 [00104] Остальные 3 из 6 конструкций КМ.САР, описанных в указанном примере, содержали костимулирующий эндодомен 4-1ВВ (CD137) и имели следующие последовательности:

[00105] Первая конструкция указанной группы представлена КМ.САР_h_28TM_41ВВz, которая содержит только шарнирный домен константной области тяжелой цепи IgG1 в качестве спейсера, и где внутриклеточный домен CD28 заменен на внутриклеточный домен костимулирующей молекулы 4-1ВВ, и имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

[00106] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTA
 30 GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGC
 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGACATCCTA
 CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
 CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTGCAAT
 ATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
 35 GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
 GTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
 CTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
 GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
 GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
 40 TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
 GTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
 CTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAGGTTACGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCA
 AATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAG
 TCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACG
 45 GGGCAGAAAGAACTCCTGTATATTTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAA
 CTAATCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGG
 ATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGG
 GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT

TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA
ACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
 5 CTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 32).

[00107] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 32) содержит лидерный пептид, вариабельную область легкой цепи КарраМаб, (G4S)₃-линкер, вариабельную область тяжелой цепи КарраМаб, второй (G4S)₃-линкер, шарнирный домен константной области IgG, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3-зета.

[00108] Вторая конструкция указанной группы была представлена КМ.CAR_8a_28TM_41BBz, которая содержит «стебель» CD8-альфа (Uniprot P01732, аминокислоты 138-182) в качестве спейсера и где внутриклеточный домен CD28 заменен на внутриклеточный домен костимулирующей молекулы 4-1BB и имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

[00109] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTA
GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATGTAGC
CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGACATCCTA
 20 CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAAT
ATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
GTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
 25 CTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
GTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
 30 CTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTTCGC
AGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCAC
ACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTC
CTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGG
GGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAAC
 35 TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGA
TGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGG
CCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA
CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA
 40 GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
TGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 33).

[00110] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 33) содержит лидерный пептид, вариабельную область легкой цепи КарраМаб, (G4S)₃-линкер, вариабельную область тяжелой цепи КарраМаб, «стебель» CD8-альфа, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3-зета.

[00111] Третья конструкция указанной группы представлена

KM.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz, которая содержит шарнир, CH2- и CH3-домены константной области тяжелой цепи IgG1 в качестве спейсера, с введенными мутациями аминокислот, важных для взаимодействия CH2 с Fc-рецепторами (3-6), которые могут опосредовать сниженную выживаемость CAR-Т-клеток in-vivo (3, 6, 7) путем выведения

5 CAR-Т-клеток в ретикулоэндотелиальную систему. Последовательность нуклеиновой кислоты:

[00112] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTA
GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATGTAGC
10 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGACATCCTA
CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTTCAGCAAT
ATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
15 GTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
CTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
GAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
20 GTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
CTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAGGTTCAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCA
AATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACAGCACCTCCAGTCGCGGGA
CCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCGCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
25 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCT
30 GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGC
35 TTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTC
CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGA
TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAAGTGTGAGAGTGA
AGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT
AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG
40 GCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT
GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG
AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA
CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ
ID NO: 34).

45 [00113] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 34) содержит лидерный пептид, варибельную область легкой цепи КарпаMab, (G4S)₃-линкер, варибельную область тяжелой цепи КарпаMab, второй (G4S)₃-линкер, мутированный шарнирный, CH2- и CH3-домены константной области IgG1, трансмембранный домен

CD28, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3-зета.

Мутированный шарнирный домен IgG1 содержит, в направлении от 5' к 3', мутации E233P, L234V, L235A, G236-, S254A, D265N и N297A, выделенные в указанной конструкции затемненными прямоугольниками (SEQ ID NO: 34). Мутации в указанных участках (E233P, L234V, L235A, G236-, S254A, D265N, N297A) могут снижать взаимодействие Fc с CAR-T-клетками, обеспечивая улучшенную выживаемость после инфузии.

[00114] Добавление элемента «рибосомального перепрыгивания» 2A и eGFP в KM.CAR

[00115] Для облегчения детекции Т-клеток, экспрессирующих каждый из описанных выше CAR, синтезировали eGFP с 5'-элементом «рибосомального перепрыгивания» T2A с перекрывающимися последовательностями с CAR- эндодоменом CD3-зета и остовом плазмиды. Затем их клонировали путем расщепления рестрикционными ферментами и лигирования в содержащие CAR транспозонные плазмиды pVAX1 PB с получением следующих конструкций.

[00116] Конструкции, содержащие эндодомен 28z _2A_GFP:

[00117] 1. pVAX1PB KM.CAR_hCH2CH3_28z_2A_GFP

[00118] 2. pVAX1PB KM.CAR_hCH3_28z_2A_GFP

[00119] 3. pVAX1PB KM.CAR_h_28z_2A_GFP

[00120] 4. pVAX1PB KM.CAR_8a_28z_2A_GFP

[00121] Конструкции, содержащие эндодомен 41BBz _2A_GFP:

[00122] 1. pVAX1PB KM.CAR_h_28TM_41BBz_2A_GFP

[00123] 2. pVAX1PB KM.CAR_8a_28TM_41BBz_2A_GFP

[00124] 3. pVAX1PB KM.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz_2A_GFP

[00125] Получение KM.CAR-T-клеток с костимулирующим доменом 4-1BB.

[00126] Проводили сравнение предварительных KM.CAR_hCH2CH3_28z и 4-1BB-содержащих CAR. KM.CAR-T-клетки получали путем электропорации с применением системы PiggyBac согласно приведенному ранее в настоящем документе описанию и известной в данной области техники (2). 4 млн мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) от здоровых доноров электропорировали с применением системы электропорации Neon при 2400 В в течение 20 мс, в одноимпульсном режиме, в присутствии 5 мкг каждой из транспозазной и транспозонной PiggyBac-плазмид. Протестированные конструкции KMA.CAR включали KM.CAR_hCH2CH3_28z_2A_GFP; KM.CAR_h_28TM_41BBz_2A_GFP; KM.CAR_8a_28TM_41BBz_2A_GFP; или KM.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz_2A_GFP.

[00127] Электропорированные МКПК (CAR-МКПК) выдерживали в покое в течение ночи в AIMV с 10% фетальной бычьей сыворотки (AIM-V CM), собирали, промывали и ресуспендировали в AIM-V CM до плотности 1×10^6 /мл. CAR-МКПК совместно культивировали с аутологичными облученными питающими клетками МКПК в присутствии или в отсутствие облученных KMA-экспрессирующих клеток JJN3 с соотношением CAR-МКПК:JJN3, составляющим 5:1. Каждые 3 дня добавляли интерлейкин-15 (ИЛ-15) в количестве 10 нг/мл. Клетки подсчитывали путем вытеснения трипанового синего, и каждые 7 дней добавляли свежие облученные стимуляторы/питающие клетки.

[00128] Оценка экспрессии KM.CAR

[00129] Экспрессию KM.CAR оценивали с помощью проточной цитометрии в начале культивирования (1 день), на 15 день и 21 день (фиг. 8A-8B). В культурах KM.CAR-T-клеток выполняли поверхностное окрашивание антителом к CD3 человека и оценивали экспрессию CAR по экспрессии GFP.

[00130] КМ.CAR-T-клеткам требуется каппа-антиген миеломы для персистенции in-vitro

[00131] Культуры, содержащие КМА-экспрессирующие клетки линии JJN3, демонстрировали более высокий общий уровень размножения, повышенную экспрессию КМ.CAR или и то, и другое, по сравнению с культурами, содержащими только МКПК (фиг. 8А-8В). В соответствии с известным взаимодействием СН2-домена константной области IgG с Fc-рецепторами, проводили обогащение экспрессирующими

КМ.CAR_hCH2CH3_28z Т-клетками в присутствии только МКПК (28% CD3⁺ Т-клеток), однако более высокие уровни размножения и обогащения наблюдались при добавлении клеток JJN3 (15-кратное размножение при 38% уровне экспрессии CAR по сравнению с 6-кратным размножением при 29% уровне экспрессии CAR).

[00132] Экспрессирующие КМ.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz Т-клетки демонстрировали крайне незначительный уровень экспрессии CAR (6%) и размножения (6-кратное) в присутствии только МКПК, по сравнению с совместным культивированием с JJN3 (26% уровень экспрессии CAR и 17-кратное размножение). КМ.CAR-T-клетки, содержащие только шарнир IgG1 в качестве спейсера, демонстрировали аналогичный уровень размножения (5-кратное при JJN3, 6-кратное без JJN3), при повышенной экспрессии CAR (17% при JJN3, 9% без JJN3). Только КМ.CAR-T-клетки, содержащие цепь CD8-альфа в качестве спейсера, не демонстрировали какого-либо увеличения размножения или обогащения в присутствии клеток JJN3 (8-кратное размножение и 5% уровень экспрессии CAR в присутствии JJN3, по сравнению с 5-кратным размножением и 5% уровнем экспрессии CAR без JJN3).

[00133] Функциональная оценка КМ.CAR-T-клеток

[00134] Оценивали синтез КМА-специфического интерферона-гамма и цитотоксичность КМ.CAR-T-клеток посредством проточно-цитометрического анализа на внутриклеточные цитокины и стандартного анализа с высвобождением хрома на линиях КМА+ и КМА- клеток, с применением ранее описанных протоколов (2). И использованные линии КМА-положительных клеток включали JJN3, Pfeiffer, NCI-H929. Линии КМА-отрицательных клеток включали Nalm-6 и Molt (фиг. 12А-12В).

[00135] Для проточно-цитометрического анализа на цитокины, 2×10⁵ КМ.CAR-T-клетки стимулировали целевыми клетками в соотношении 1:1 в течение 5 часов. Через 1 час добавляли монензин (2 мкМ) (BD Biosciences) и брефелдин А (1 мкг/мл) (BD Biosciences). CAR-T-клетки, неспецифически активированные 50 нг/мл форболмиристатацетата (ФМА: Sigma-Aldrich) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich) и нестимулированные клетки применяли в качестве положительного и отрицательного контролей. Затем CAR-T-клетки собирали, промывали, проводили поверхностное окрашивание на CD3, CD4 и CD8. CAR-T-клетки фиксировали и пермеабилizировали цитофиксом и буфером Perm/Wash (BD Biosciences), и окрашивали антителом против интерферона гамма (BD Biosciences) с последующим дополнительным промыванием буфером Perm/Wash. Окрашенные клетки анализировали с применением проточного цитометра FACSCantoTM II с регистрацией по меньшей мере 30 000 событий.

[00136] КМА-специфическую цитотоксичность оценивали с применением стандартного анализа с высвобождением хрома (⁵¹Cr). Целевые клетки метили хроматом натрия (Na₂⁵¹CrO₄) (Perkin-Elmer, Уолтем, Массачусетс, США). КМ.CAR-T-клетки предварительно инкубировали с клетками линии K562 в соотношении 1:1 для компенсации активности НК-клеток. Меченые хромом целевые клетки добавляли к КМ.CAR-T-клеткам в трех повторностях при соотношении эффекторных:целевых клеток

в диапазоне от 40:1 до 1,25:1, и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 4 часов.

Целевые клетки в трех повторностях лизировали 10% додецилсульфата натрия для определения максимального высвобождения; целевые клетки в трех повторностях без эффекторов применяли для оценки спонтанного высвобождения. Супернатанты аспирировали и считывали с применением счетчика для планшетов MicroBeta2 (PerkinElmer). Процент специфического лизиса рассчитывали с применением стандартной формулы: % специфического лизиса = (экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение) / (максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение) × 100]

Пример 4: получение плазмиды с транспозоном PiggyBac с индуцируемым активацией промотором

[00137] Разрабатывали и клонировали одну транспозонную кассету, содержащую конститутивно активный промотор (EF1альфа) и индуцируемый активацией промотор (NFATpro). Индуцируемую активацией генную экспрессионную кассету получали путем разработки NFATpro с применением Clone Manager 9 (Sci-Ed Software), на основе источника: Fiering et al (8). Она включает 6 копий последовательности ДНК размером 30 п.о. (элемент ответа - RE), связанных ядерным фактором активированных Т-клеток (NFAT-RE) - GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT (SEQ ID NO: 35), за которыми следует минимальный промотор ИЛ-2 - ACATTTTGACACCCCATATAATTTTCCAG AATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCA СТАCTCACAGTAACCTCAACTCCTG (SEQ ID NO: 36), обнаруживаемый на хромосоме 4 (референсная последовательность NCBI: NG_016779.1).

[00138] Для обеспечения детекции индуцированной активацией генной экспрессии в направлении 3' от NFATpro размещают последовательность ДНК усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP), за которой следует сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH) (9-11). Последовательность ДНК указанной генной кассеты приведена ниже.

[00139]

GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAG
AAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTGTCCCATCGAAT
TAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACA
GAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTGTCCCGGGAC
ATTTTGACACCCCATATAATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGT
CAA GAGTTCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGAAC
TCCATGG ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGG
TCGAGCTGGAC GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGA
GGGCGATGCCACCTA CGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
TGCCCCTGCCCTGGCCAC CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCA
GCCGCTACCCCGACCATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA
GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTT CTTCAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCC TGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG CACAAGCTGGAGTACAACCTACA
ACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA GAACGGCATCAAGGTGAA
CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC TCGCCGACCACTACC
AGCAGAACACCCCATCGGATCCGGAGCCACGAACCTCTCTCTGT TAAAGCAAGCA
GGAGACGTTGAAGAAAACCCCGGTCTTAAATCCTCGACTGTGCCT TCTAGTTG
CCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTG CCAC
TCCCACTGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTG
TCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA

GACA ATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGC (SEQ ID NO: 37).

[00140] В направлении от 5' к 3' указанные конструкции содержат NFAT-RE, минимальный промотор ИЛ-2, eGFP и сигнал полиаденилирования BGH.

[00141] Указанную кассету синтезировали с использованием коммерческого сервиса Genscript и клонировали в транспозонную плазмиду pVAX1PB между 5'-инсулятором cHS4 (GenBank: U78775.2) (12) и промотором фактора удлинения 1 человека. Для идентификации трансдуцированных Т-клеток в начальных экспериментах гибридный маркер RQR8, состоящий из эпитопа CD34, распознаваемого моноклональным антителом QBEnd10, и мимеотопов CD20-специфического моноклонального антитела Ритуксимаб (13) клонировали в сайт множественного клонирования транспозона для получения транспозонной генной вставки, показанной на фиг. 9 (плазмида pVAX1PB NFATGFP-RQR8). Совместная электропорация индуцируемой активацией генной кассеты, содержащей транспозонную плазмиду pVAX1PB NFATGFP-RQR8 и транспозазную плазмиду pVAX1 PBase, приводит к стойкой интеграции генной вставки NFATGFP-RQR8, показанной на фиг. 9.

Демонстрация функции индуцируемого активацией гена, содержащего транспозон [00142] Для демонстрации функции транспозона pVAX1PB NFATGFP-RQR8 из примера 4 (см. фиг. 9) 4×10^6 МКПК электропорировали в присутствии 5 мкг каждой из транспозонных и транспозазных плазмид. Электропорированные клетки выдерживали в покое в течение 24 часов и затем неспецифически стимулировали в течение ночи 50 нг/мл форболмиристатацетата (ФМА: Sigma-Aldrich) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich), и сравнивали с нестимулированными контролями. Трансдуцированные клетки идентифицировали по окрашиванию QBEnd10 при экспрессии маркера RQR8; через 19 часов оценивали индуцированную активацией генную экспрессию (eGFP). В указанный момент времени экспрессия eGFP наблюдалась в 50% трансдуцированных клеток (фиг. 10).

Пример 5: разработка контролируемой биологической КМ.CAR-терапии

[00143] Также конструировали экспрессионные плазмиды, содержащие ИЛ-12 и/или антагонист рецептора интерлейкина-6 SANT7, а также содержащие оптимизированный химерный антигенный рецептор с экспрессией ИЛ-12 и/или SANT7 под контролем индуцируемого активацией промотора (Hooijberg et al. 2000). Последовательность SANT-7 была предоставлена профессором Рокко Савино (Prof. Rocco Savino) и была основана на мутированной генной последовательности ИЛ-6 дикого типа (референсная последовательность NCBI: NM_000600.4) согласно Savino et al 1994 и Sporeno et al 1996 (14-17). Указанную последовательность импортировали в Clone Manager 9 (Sci-Ed Software) и добавляли 6xHis-метку для детекции в супернатантах посредством ИФА ELISA.

[00144] В предложенной последовательности нуклеотидов SANT-7, приведенной ниже, выделены замены аминокислот:

[00145] MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERI
DKQIRDILDFISALRKETCNKSNMCESSKEADAFWNLNLPKMAEKDGCIFYKGFNEETCL
VKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESEEQARAVQMRTKDLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTN
ASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLIRSLRALRAMHHHHHHH (SEQ ID NO: 38).
Замены нуклеотидов соответствуют Y31D, G35F, L57D, E59F, N60W, Q75Y, S76K, S118R, V121D. Предложенная последовательность также содержала замену Q211A, не
указанную в опубликованной последовательности.

[00146] Последовательность ДНК, соответствующая указанной последовательности аминокислот (т.е. SEQ ID NO: 38):

[00147] ATGAACCTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGG

CTGCTCCTGGTGTTGCCTGCTGCCTTCCCTGCCCCAGTACCCCCAGGAGAAGATTCC
 AAAGATGTAGCCGCCCCACACAGACAGCCACTCACGAGCTCAGAACGAATTGACAA
 ACAAAATTCGGGACATCCTCGACTTTATCTCAGCCTTAAGAAAGGAGACATGTAACA
 AGAGTAACATGTGTGAGAGCTCCAAAGAGGCAGACGCATTCTGGAACCTGAACCTT
 5 CCAAAGATGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCTACAAAGGATTCAATGAGGAGACTTG
 CCTGGTGAAAATCATCACTGGTCTTCTCGAGTTTGAGGTATACCTAGAGTACCTCCA
 GAACAGATTTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCCAGAGCTGTGCAGATGCGCACAAAA
 GACCTGATCCAGTTCCCTGCAGAAAAAGGCAAAGAATCTAGATGCAATAACCACCCC
 TGACCCAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCTGCAGGCACAGAACCAGTGGC
 10 TGCAGGACATGACAACCTCATCTCATTCTGAGATCTTTTAAGGAGTTCCTGATCCGTA
 GCCTGAGGGCTCTTCGGGCTATGCATCATCACCATCACCCT (SEQ ID NO: 39).

[00148] Одноцепочечная конструкция с интерлейкином-12 (Flexi-IL-12) была
 разработана путем объединения субъединиц р40 и р35 ИЛ-12 (Uniprot P29459 и P29460)
 с применением гибкого (G₄S)₃-линкера, аналогично описанию у Zhang et al и Chinnasamy
 15 et al (18, 19), что позволяет экспрессировать обе субъединицы в виде одной пептидной
 цепи, которая легко образует биоактивный гетеродимер р70. Синтезировали
 конструкцию Flexi-IL-12 и клонировали конструкции, содержащие ИЛ-12 и SANT7, в
 индуцируемую активацией транспозонную кассету, описанную в настоящем документе
 и показанную на фиг. 11.

20 [00149] Кроме того, может быть синтезирована конструкция Flexi-IL-12 и конструкции,
 содержащие ИЛ-12 и SANT7, разделенные элементами «рибосомального
 перепрыгивания» 2А, могут быть клонированы в плазмиду PiggyBac, описанную в
 настоящем документе и показанную на фиг. 7.

[00150] Последовательность аминокислот Flexi-IL-12:

25 [00151] MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC
 DTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED
 GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV
 TCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS
 FFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK
 30 DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSR
 NLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEDHEDITKDKTSTV
 EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFK^{TMN}
 AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAF
 RIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 40).

35 [00152] В направлении от 5' к 3' конструкция Flexi-IL-12 содержит лидерный пептид,
 субъединицу р40 ИЛ-12, (G₄S)₃-линкер и субъединицу р35 ИЛ-12.

[00153] Последовательность ДНК, соответствующая приведенной выше
 последовательности аминокислот (т.е. SEQ ID NO: 40):

40 [00154] ATGTGTCAACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCA
 TCTCCCCCTCGTGGCCATATGGGAAGTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAATTGGAT
 TGGTATCCGGATGCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGA
 AGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAA
 CCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAA
 GGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAAT
 45 TTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAGACCTTTCTAA
 GATGCGAGGCCAAGAATTATCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACAATC
 AGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAGCAGCAGAGGCTCTTCTGACCCCCAAGG
 GGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAG

GAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGCTGAGGA
 GAGTCTGCCCATTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTTACAAGCTCAAGTATGAAAACCT
 ACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAAGTCTG
 CAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGA
 5 CACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGG
 CAAGAGCAAGAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGGACAAGACCTCAGCCACG
 GTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTACTATAG
 CTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTGGTGGCGGTGGAAGCGGCG
 GTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCA
 10 GGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATG
 CTCCAGAAGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAAGAGATTGAT
 CATGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGA
 ATTAACCAAGAATGAGAGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATG
 GGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTTAGTAGTA
 15 TTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTT
 CTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGAT
 GAGCTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCT
 TGAAGAACCGGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTT
 CAGAATTCGGGCAGTGAATGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATGCTTCC (SEQ
 20 ID NO: 41).

[00155] Дополнительно также конструировали экспрессионные плазмиды, содержащие усеченную доминантно-негативную форму галектина-3, GAL3C. Указанная конструкция содержит лидерный пептид CD8-альфа для направления секреции, а также метку 6xHis для детекции. Последовательность аминокислот GAL3C приведена ниже:

25 [00156] MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRHHHHHHHGGAPAGPLIVPYNLPLPGGVVPRML
 ITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENNRVIVCNTKLDNNWGREERQSVF
 PFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHRVKKLNEISKLGISGDIDLTASASY™
 (SEQ ID NO: 42)

[00157] Соответствующая последовательность ДНК конструкции GAL 3C приведена
 30 ниже:

[00158] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGACATCATCACCATCACCACGGCGCCCCTGCTGGGCCACTGATTGTG
 CCTTATAACCTGCCTTTGCCTGGGGGAGTGGTGCCTCGCATGCTGATAACAATTCTG
 GGCACGGTGAAGCCCAATGCAAACAGAATTGCTTTAGATTTCCAAGAGGGGAATGA
 35 TGTTCCTTCCACTTTAACCCACGCTTCAATGAGAACAACAGGAGAGTCATTGTTTG
 CAATACAAAGCTGGATAATAACTGGGGAAGGGAAGAAAGACAGTCGGTTTTCCCAT
 TTGAAAGTGGGAAACCATTTCAAAATACAAGTACTGGTTGAACCTGACCACTTCAAG
 GTTGCAGTGAATGATGCTCACTTGTTCAGTACAATCATCGGGTTAAAAAACTCAAT
 GAAATCAGCAAACTGGGAATTTCTGGTGACATAGACCTCACCAGTGCTTCATATACC
 40 ATGATA (SEQ ID NO: 43)

[00159] Проводят нуклеофекцию содержащими CAR и «биологические средства» транспозонными плазмидами с получением CAR-Т-клеток, экспрессирующих либо только ИЛ-12, либо только SANT7, либо только GAL3C, или же и ИЛ-12, и SANT7; или и IL12, и GAL3C; или и SANT7, и GAL3C; или все три молекулы: ИЛ-12, SANT7 и GAL3C.
 45 Клетки, успешно трансдуцированные конструкциями с «биологическими средствами», могут быть идентифицированы по экспрессии селективного маркера, например, с помощью проточной цитометрии. Уровни ИЛ-12, SANT7 и/или GAL3C измеряют внутриклеточно путем проточно-цитометрического анализа на цитокины и в

супернатантах культур CAR-T-клеток путем ИФА ELISA с применением коммерческих наборов и реагентов, и сравнивали с контрольными Т-клетками, экспрессирующими CAR отдельно. Функцию CAR-T-клеток оценивают путем проточно-цитометрического анализа на цитокины и анализов на цитотоксичность согласно описанию выше, а также анализов с совместным культивированием с клетками линий миеломы для оценки ингибирования опухолевого роста. Эксперименты проводят в трех повторностях и выбирают 2 оптимальные идентифицированные конструкции CAR для оценки в модели на мышах с экспрессией и без экспрессии ИЛ-12, GAL3C и/или SANT7.

[00160] На основе созданной ранее модели ксенотрансплантата миеломы человека RPMI-Rag у мышей разрабатывают модели RPMI-Rag-Luc (КМА-) и JN3-Rag-Luc (КМА+) для оценки функции полученных авторами настоящего изобретения CAR-T-клеток *in vivo*. Клетки JN3 и RPMI8226 трансфицируют Luc-1 и затем инокулируют в/в мышам Rag2-/-γс-/- (BALB/c) для получения моделей MM JN3- Rag-Luc и RPMI-Rag-Luc.

Проводят мониторинг приживления и уровней заболевания путем оптической визуализации после в/в инъекции люциферина, и сопоставляли с уровнями легких цепей каппа (JN3) и лямбда (RPMI) сыворотки человека. Устанавливают оптимальное время для инокуляции кандидатными CAR-T-клетками с применением оптической визуализации до развития паралича задних конечностей, обычно с 5-8 недель. В когортах по 6 мышей JN3-Rag-Luc и RPMI-Rag-Luc мышам инокулируют в/в возрастающие дозы CAR-T-клеток (с экспрессией и без экспрессии ИЛ-12/SANT7) для установления терапевтической дозы, начиная с общей дозы клеток 1×10^6 . Снимки мышей получают на 0, +1, +3, +8 дни и затем еженедельно до развития прогрессирования заболевания по оценке на основании развития паралича задних конечностей, повышения содержания свободных легких цепей сыворотки (SFLC) или другие институциональных стандартов. Опухоли костного мозга и экстрамедуллярные опухоли собирают и проводят гистологическое исследование распределения клеток MM и CAR-T-клеток. Эффективность определяют по ответу по данным визуализации ответа и выживаемости по сравнению с контролями.

Основные признаки настоящего изобретения перечислены в следующих пунктах.

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий один или больше внутриклеточных сигнальных доменов и внеклеточный антигенсвязывающий домен, причем указанный внеклеточный антигенсвязывающий домен специфически распознает каппа-антиген миеломы (КМА).

2. Химерный антигенный рецептор по п. 1, в котором указанный один или больше внутриклеточных сигнальных доменов содержит один или больше костимулирующих эндодоменов.

3. Химерный антигенный рецептор по п. 2, в котором указанный один или больше костимулирующих эндодоменов представляет собой что-либо одно или больше из домена CD28, домена CD3ζ, домена 4-1BB или домена OX-40, или их комбинаций.

4. Химерный антигенный рецептор по п. 3, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3ζ и домен CD28.

5. Химерный антигенный рецептор по п. 3, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3ζ и домен OX-40.

6. Химерный антигенный рецептор по п. 4, дополнительно содержащий домен OX-40.

7. Химерный антигенный рецептор по п. 3, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3ζ и домен 4-1BB.

8. Химерный антигенный рецептор по п. 4, дополнительно содержащий домен 4-1BB.

9. Химерный антигенный рецептор по п. 7, дополнительно содержащий домен OX-

40.

10. Химерный антигенный рецептор по п. 1, в котором указанный внеклеточный связывающий домен содержит одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически распознает КМА.

5 11. Химерный антигенный рецептор по п. 10, в котором указанный scFv содержит определяющие комплементарность участки (CDR), происходящие из моноклонального антитела КарраMab, при этом участки CDR указанных КарраMab содержат последовательности SEQ ID NO: 3-8.

10 12. Химерный антигенный рецептор по п. 10, в котором указанный scFv содержит VL-цепь и VH-цепь КарраMab, при этом VL-цепь содержит SEQ ID NO: 2, а VH-цепь содержит SEQ ID NO: 1.

13. Химерный антигенный рецептор по п. 11, в котором указанные VL-цепь и VH-цепь КарраMab соединены глицин-сериновым линкером.

14. Химерный антигенный рецептор по п. 13, в котором указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот.

15 15. Химерный антигенный рецептор по п. 14, в котором указанный линкер из 15 аминокислот содержит (Gly₄Ser)₃.

16. Химерный антигенный рецептор по п. 10, в котором указанный scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным сигнальным доменам спейсером.

20 17. Химерный антигенный рецептор по п. 16, в котором указанный спейсер представляет собой константную область иммуноглобулина или цепь CD8α.

18. Химерный антигенный рецептор по п. 17, в котором указанная константная область иммуноглобулина содержит что-либо одно или больше из шарнирного домена IgG, CH2-домена IgG и CH3-домена IgG.

25 19. Химерный антигенный рецептор по п. 18, в котором указанная константная область иммуноглобулина содержит шарнирный домен иммуноглобулина.

20. Химерный антигенный рецептор по п. 19, в котором указанная константная область иммуноглобулина дополнительно содержит CH3-домен IgG.

30 21. Химерный антигенный рецептор по п. 19 или 20, в котором указанная константная область иммуноглобулина дополнительно содержит CH2-домен IgG.

22. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 17-21, в котором указанный спейсер присоединен к scFv глицин-сериновым линкером.

23. Химерный антигенный рецептор по п. 22, в котором указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот.

35 24. Химерный антигенный рецептор по п. 23, в котором указанный линкер из 15 аминокислот содержит (Gly₄Ser)₃.

25. Генетически модифицированная Т-клетка, сконструированная с возможностью экспрессии химерного антигенного рецептора по любому из пп. 1-24.

40 26. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 25, сконструированная с дополнительной возможностью экспрессии одной или больше дополнительных биологических молекул.

27. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 26, причем указанная одна или больше дополнительных биологических молекул содержит что-либо одно или больше из ИЛ-12, GAL3C или SANT7.

45 28. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 26, причем указанная одна или больше дополнительных биологических молекул представляет собой ИЛ-12, и указанный ИЛ-12 экспрессируется одноцепочечным полипептидом, содержащим одну субъединицу p35 ИЛ-12 и одну субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером.

29. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 28, причем указанный гибкий линкер представляет собой линкер (G₄S)₃.

30. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 29, причем указанный одноцепочечный полипептид, содержащий одну субъединицу р35 ИЛ-12 и одну субъединицу р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, образует биоактивный гетеродимер р70 ИЛ-12.

31. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 26, сконструированная с возможностью экспрессии ИЛ-12 и селективного маркера.

32. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 26, сконструированная с возможностью экспрессии SANT-7.

33. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 26, сконструированная с возможностью экспрессии SANT-7 и селективного маркера.

34. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 31, сконструированная с дополнительной возможностью экспрессии SANT7.

35. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 26, сконструированная с возможностью экспрессии GAL3C.

36. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 26, сконструированная с возможностью экспрессии GAL3C и селективного маркера.

37. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 31, сконструированная с дополнительной возможностью экспрессии GAL3C.

38. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 31, сконструированная с дополнительной возможностью экспрессии GAL3C и SANT7.

39. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 33, сконструированная с дополнительной возможностью экспрессии GAL3C.

40. Способ получения генетически модифицированной Т-клетки, включающий введение в Т-клетку экспрессионного вектора, кодирующего CAR, содержащий один или больше внутриклеточных сигнальных доменов и внеклеточных антигенсвязывающих доменов, причем указанный внеклеточный антигенсвязывающий домен специфически распознает каппа-антиген миеломы (KMA).

41. Способ по п. 40, в котором указанный экспрессионный вектор представляет собой экспрессионную систему на основе транспозируемого вектора.

42. Способ по п. 40, в котором указанный экспрессионный вектор представляет собой экспрессионный вектор с транспозоном PiggyBac.

43. Способ по п. 40, в котором указанное введение включает электропорацию.

44. Способ по п. 40, в котором указанный один или больше внутриклеточных сигнальных доменов содержит один или больше костимулирующих эндодоменов.

45. Способ по п. 44, в котором указанный один или больше костимулирующих эндодоменов представляет собой что-либо одно или больше из домена CD28, домена CD3ζ, домена 4-1BB или домена OX-40, или их комбинаций.

46. Способ по п. 45, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3ζ и домен CD28.

47. Способ по п. 45, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3ζ и домен OX-40.

48. Способ по п. 46, в котором указанный CAR дополнительно содержит домен OX-40.

49. Способ по п. 45, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3ζ и домен 4-1BB.

50. Способ по п. 46, в котором указанный CAR дополнительно содержит домен 4-

1BB.

51. Способ по п. 50, в котором указанный CAR дополнительно содержит домен OX-40.

52. Способ по п. 40, в котором указанный внеклеточный связывающий домен содержит scFv, который специфически распознает КМА.

53. Способ по п. 52, в котором указанный scFv содержит определяющие комплементарность участки (CDR), происходящие из моноклонального антитела КарраМаб, при этом указанные CDR содержат последовательности SEQ ID NO: 3-8.

54. Способ по п. 53, в котором указанный scFv содержит VL-цепь и VH-цепь моноклонального антитела КарраМаб, при этом указанная VL-цепь содержит SEQ ID NO: 2, а указанная VH-цепь содержит SEQ ID NO: 1.

55. Способ по п. 54, в котором указанные участки CDR VL и участки CDR VH соединены глицин-сериновым линкером.

56. Способ по п. 55, в котором указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот.

57. Способ по п. 56, в котором указанный линкер из 15 аминокислот содержит (Gly₄Ser)₃.

58. Способ по п. 52, в котором указанный scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным сигнальным доменам спейсером.

59. Способ по п. 58, в котором указанный спейсер представляет собой константную область иммуноглобулина или цепь CD8α.

60. Способ по п. 59, в котором указанная константная область иммуноглобулина содержит что-либо одно или больше из шарнирного домена IgG, CH2-домена IgG и CH3-домена IgG.

61. Способ по п. 59, в котором указанная константная область иммуноглобулина содержит шарнирный домен иммуноглобулина.

62. Способ по п. 61, в котором указанная константная область иммуноглобулина дополнительно содержит CH3-домен IgG.

63. Способ по п. 61 или 62, в котором указанная константная область иммуноглобулина дополнительно содержит CH2-домен IgG.

64. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 59-63, в котором указанный спейсер присоединен к scFV глицин-сериновым линкером.

65. Химерный антигенный рецептор по п. 22, в котором указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот.

66. Химерный антигенный рецептор по п. 23, в котором указанный линкер из 15 аминокислот содержит (Gly₄Ser)₃.

67. Способ по п. 40, дополнительно включающий введение одного или больше дополнительных экспрессионных векторов, способных экспрессировать одну или больше дополнительных биологических молекул.

68. Способ по п. 67, в котором указанная одна или больше дополнительных биологических молекул содержит что-либо одно или больше из ИЛ-12, GAL3C или SANT7.

69. Способ по п. 68, в котором указанная одна или больше дополнительных биологических молекул представляет собой ИЛ-12, и указанный ИЛ-12 экспрессируется одноцепочечной конструкцией, содержащей субъединицу p35 ИЛ-12 и субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером.

70. Способ по п. 69, в котором указанный гибкий линкер представляет собой

(G₄S)₃-линкер.

71. Способ по п. 70, в котором указанная одноцепочечная конструкция, содержащая субъединицу р35 ИЛ-12 и субъединицу р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, образует биоактивный гетеродимер р70 ИЛ-12.

72. Способ по п. 67, в котором указанный один или больше дополнительных биологических агентов экспрессируется конструкцией, дополнительно кодирующей селективный маркер.

73. Способ по п. 72, в котором указанная конструкция кодирует ИЛ-12 и селективный маркер, при этом кодирующие последовательности указанного селективного маркера и ИЛ-12 соединены последовательностью, кодирующей элемент «рибосомального перепрыгивания» 2А.

74. Способ по п. 72, в котором указанная конструкция кодирует SANT7 и селективный маркер, при этом кодирующие последовательности указанного селективного маркера и SANT7 соединены последовательностью, кодирующей элемент «рибосомального перепрыгивания» 2А.

75. Способ по п. 72, в котором указанная конструкция кодирует GAL3С и селективный маркер, при этом кодирующие последовательности указанного селективного маркера и GAL3С соединены последовательностью, кодирующей элемент «рибосомального перепрыгивания».

76. Способ по п. 74, в котором указанная конструкция дополнительно кодирует GAL3С, при этом кодирующая последовательность GAL3С соединена с кодирующей последовательностью SANT7 в указанной конструкции дополнительным элементом «рибосомального перепрыгивания» 2А.

77. Способ по п. 73, в котором указанная конструкция дополнительно кодирует SANT7, при этом кодирующая последовательность SANT7 соединена с кодирующей последовательностью ИЛ-12 в указанной конструкции дополнительной кодирующей последовательностью элемента «рибосомального перепрыгивания» 2А.

78. Способ по п. 73, в котором указанная конструкция дополнительно кодирует GAL3С, при этом кодирующая последовательность GAL3С соединена с кодирующей последовательностью ИЛ-12 в указанной конструкции дополнительной кодирующей последовательностью элемента «рибосомального перепрыгивания» 2А.

79. Способ по п. 78, в котором указанная конструкция дополнительно кодирует SANT7, при этом кодирующие последовательности каждого из ИЛ-12, SANT7, GAL3С и селективного маркера соединены элементом «рибосомального перепрыгивания» 2А.

80. Способ лечения КМА-экспрессирующего злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение генетически модифицированных Т-клеток, сконструированных с возможностью экспрессии одного или больше внутриклеточных сигнальных доменов и внеклеточных антигенсвязывающих доменов, причем указанный внеклеточный антигенсвязывающий домен специфически распознает каппа-антиген миеломы (КМА).

81. Способ по п. 80, в котором указанное КМА-экспрессирующее злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ) или амилоидоз.

82. Способ по п. 80, в котором указанный один или больше внутриклеточных сигнальных доменов содержит один или больше костимулирующих эндодоменов.

83. Способ по п. 82, в котором указанный один или больше костимулирующих эндодоменов представляет собой что-либо одно или больше из домена CD28, домена CD3ζ, домена 4-1BB или домена OX-40 или их комбинаций.

84. Способ по п. 83, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3 ζ и домен CD28.

85. Способ по п. 83, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3 ζ и домен OX-40.

5 86. Способ по п. 84, в котором указанный внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит домен OX-40.

87. Способ по п. 83, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3 ζ и 41-BB домен.

88. Способ по п. 84, дополнительно содержащий 41-BB домен.

10 89. Способ по п. 80, в котором указанный внеклеточный связывающий домен содержит scFv, который специфически распознает КМА.

90. Способ по п. 89, в котором указанный scFv распознает КМА и содержит определяющие комплементарность участки (CDR), происходящие из моноклонального антитела КарраМаб, при этом указанные участки CDR содержат последовательности
15 SEQ ID NO: 3-8.

91. Способ по п. 89, в котором указанный scFv содержит VL-цепь и VH-цепь моноклонального антитела КарраМаб, в котором указанная VL-цепь содержит SEQ ID NO: 2 и указанная VH-цепь содержит SEQ ID NO:1.

92. Способ по п. 91, в котором VL из SEQ ID NO: 2 и VL из SEQ ID NO: 1 присоединены
20 глицин-сериновым линкером.

93. Способ по п. 92, в котором указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот.

94. Способ по п. 93, в котором указанный линкер из 15 аминокислот содержит (Gly₄Ser)₃.

25 95. Способ по п. 89, в котором указанный scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным сигнальным доменам спейсером.

96. Способ по п. 95, в котором указанный спейсер представляет собой константную область иммуноглобулина или цепь CD8 α .

30 97. Способ по п. 96, в котором указанная константная область иммуноглобулина содержит что-либо одно или больше из шарнирного домена IgG, CH2-домена IgG и CH3-домена IgG.

98. Способ по п. 97, в котором указанная константная область иммуноглобулина содержит шарнирный домен иммуноглобулина.

35 99. Способ по п. 98, в котором указанная константная область иммуноглобулина дополнительно содержит CH3-домен IgG.

100. Способ по п. 98 или 99, в котором указанная константная область иммуноглобулина дополнительно содержит CH2-домен IgG.

101. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 96-100, в котором указанный спейсер присоединен к scFV глицин-сериновым линкером.

40 102. Химерный антигенный рецептор по п. 101, в котором указанный глицин-сериновый линкер представляет собой линкер из 15-20 аминокислот.

103. Химерный антигенный рецептор по п. 102, в котором указанный линкер из 15 аминокислот содержит (Gly₄Ser)₃.

45 104. Способ по п. 80, в котором указанные генетически модифицированные Т-клетки сконструированы с дополнительной возможностью экспрессии одной или больше дополнительных биологической молекулы.

105. Способ по п. 104, в котором указанная одна или больше дополнительных биологических молекул содержит что-либо одно или больше из ИЛ-12, GAL3C или

SANT7.

106. Способ по п. 104, в котором указанная одна или больше дополнительных биологических молекул представляет собой ИЛ-12, и указанный ИЛ-12 экспрессируется в виде одноцепочечного полипептида, содержащего субъединицу р35 ИЛ-12 и субъединицу р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером.

107. Способ по п. 106, в котором указанный гибкий линкер представляет собой $(G_4S)_3$ -линкер.

108. Способ по п. 106, в котором указанный одноцепочечный полипептид, содержащий субъединицу р35 ИЛ-12 и субъединицу р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, образует биоактивный гетеродимер р70 ИЛ-12.

109. Способ по п. 105, в котором указанные CAR-T-клетки сконструированы с возможностью экспрессии ИЛ-12 и селективного маркера.

110. Способ по п. 104, в котором указанные CAR-T-клетки сконструированы с возможностью экспрессии SANT7 и селективного маркера.

111. Способ по п. 104, в котором указанные CAR-T-клетки сконструированы с возможностью экспрессии GAL3C и селективного маркера.

112. Способ по п. 104, в котором указанные CAR-T-клетки сконструированы с возможностью экспрессии SANT7, ИЛ-12 и селективного маркера.

113. Способ по п. 104, в котором указанные CAR-T-клетки сконструированы с возможностью экспрессии SANT7, GAL3C и селективного маркера.

114. Способ по п. 104, в котором указанные CAR-T-клетки сконструированы с возможностью экспрессии ИЛ-12, GAL3C и селективного маркера.

115. Способ по п. 104, в котором указанные CAR-T-клетки сконструированы с возможностью экспрессии ИЛ-12, GAL3C, SANT7 и селективного маркера.

116. Способ по п. 80, дополнительно включающий введение одного или больше дополнительных биологических или фармацевтических активных агентов.

117. Способ по п. 116, в котором указанный один или больше дополнительных биологически активных агентов содержит ИЛ-12, антагонист рецептора ИЛ-6 или SANT7.

118. Способ по п. 116, в котором указанные дополнительные фармацевтически активные агенты содержат один или больше химиотерапевтических агентов.

119. Способ по п. 116, в котором указанный дополнительный фармацевтически активный агент представляет собой иммуномодулирующее средство.

120. Способ по п. 119, в котором указанное иммуномодулирующее средство представляет собой талидомид или его аналог.

121. Способ по п. 120, в котором указанный аналог талидомида представляет собой активид, леналидомид или помалидомид.

122. Способ по п. 116, в котором указанный дополнительный фармацевтический активный агент представляет собой ингибитор гистондеацетилазы.

123. Способ по п. 122, в котором указанный ингибитор гистондеацетилазы представляет собой панобиностат, вориностат, трихостатин А, депсипептиды, фенилбутират, вальпроевую кислоту, белиностат, LAQ824, энтиностат, CI944 или моцетиностат.

124. Способ по п. 116, в котором указанный один или больше дополнительных биологических или фармацевтических активных агентов вводят до, во время или после лечения генетически модифицированными Т-клетками.

125. Способ по п. 80, в котором указанные генетически модифицированные Т-клетки вводят внутривенно.

126. Способ по п. 80, в котором указанные генетически модифицированные Т-клетки происходят от пациента.

127. Способ по п. 80, в котором указанные генетически модифицированные Т-клетки не происходят от пациента.

5 128. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 26 или 27, сконструированная с дополнительной возможностью экспрессии ФРГ-связывающего белка.

129. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 128, отличающаяся тем, что указанный ФРГ-связывающий белок представляет собой антитело к ФРГ или его фрагмент.

10 130. Способ по п. 67 или 104, в котором указанная одна или больше дополнительных биологических молекул представляет собой ФРГ-связывающий белок.

131. Способ по п. 130, в котором указанный ФРГ-связывающий белок представляет собой антитело или его фрагмент.

15 132. Способ по п. 80, в котором указанные генетически модифицированные Т-клетки вводят до, одновременно с или после трансплантата стволовых клеток.

133. Способ по п. 132, в котором указанный трансплантат стволовых клеток представляет собой аллогенный трансплантат стволовых клеток.

134. Способ по п. 132, в котором указанный трансплантат стволовых клеток представляет собой аллогенный трансплантат стволовых клеток.

20 [00161] Список литературы

[00162] 1. Rossig C, Pscherer S, Landmeier S, Altvater B, Jurgens H, Vormoor J. Adoptive cellular immunotherapy with CD19-specific T cells. *Klin Padiatr.* 2005; 217(6):351-6.

25 [00163] 2. Ramanayake S, Bilmon I, Bishop D, Dubosq MC, Blyth E, Clancy L, et al. Low-cost generation of Good Manufacturing Practice-grade CD19-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells using piggyBac gene transfer and patient-derived materials. *Cytotherapy.* 2015.

[00164] 3. Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther.* 2010; 17(10):1206-13.

30 [00165] 4. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 2001; 276(9):6591-604.

35 [00166] 5. Armour KL, van de Winkel JG, Williamson LM, Clark MR. Differential binding to human Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIb receptors by human IgG wildtype and mutant antibodies. *Mol Immunol.* 2003; 40(9):585-93.

[00167] 6. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer immunology research.* 2015; 3(2):125-35.

40 [00168] 7. Clemenceau B, Valsesia-Wittmann S, Jallas AC, Vivien R, Rousseau R, Marabelle A, et al. In Vitro and In Vivo Comparison of Lymphocytes Transduced with a Human CD16 or with a Chimeric Antigen Receptor Reveals Potential Off-Target Interactions due to the IgG2 CH2-CH3 CAR-Spacer. *J Immunol Res.* 2015; 2015:482089.

45 [00169] 8. Fiering S, Northrop JP, Nolan GP, Mattila PS, Crabtree GR, Herzenberg LA. Single cell assay of a transcription factor reveals a threshold in transcription activated by signals emanating from the T-cell antigen receptor. *Genes Dev.* 1990; 4(10):1823-34.

[00170] 9. Miller WL, Martial JA, Baxter JD. Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J Biol Chem.* 1980; 255(16):7521-4.

[00171] 10. Miller WL, Thirion JP, Martial JA. Cloning of DNA complementary to bovine prolactin mRNA. *Endocrinology*. 1980; 107(3):851-3.

[00172] 11. Goodwin EC, Rottman FM. The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J Biol Chem*. 1992; 267(23):16330-4.

[00173] 12. Chung JH, Bell AC, Felsenfeld G. Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(2):575-80.

[00174] 13. Philip B, Thomas S, Marin V, Jathoul A, Kopec A, Linch DC, et al. A Highly Compact Epitope-Based Marker-Suicide Gene for More Convenient and Safer T-Cell Adoptive Immunotherapy. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2010; 116(21):1473-.

[00175] 14. Demartis A, Bernassola F, Savino R, Melino G, Ciliberto G. Interleukin 6 receptor superantagonists are potent inducers of human multiple myeloma cell death. *Cancer Res*. 1996; 56(18):4213-8.

[00176] 15. Savino R, Ciapponi L, Lahm A, Demartis A, Cabibbo A, Toniatti C, et al. Rational design of a receptor super-antagonist of human interleukin-6. *EMBO J*. 1994; 13(24):5863-70.

[00177] 16. Savino R, Lahm A, Salvati AL, Ciapponi L, Sporeno E, Altamura S, et al. Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation. *EMBO J*. 1994; 13(6):1357-67.

[00178] 17. Sporeno E, Savino R, Ciapponi L, Paonessa G, Cabibbo A, Lahm A, et al. Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells. *Blood*. 1996; 87(11):4510-9.

[00179] 18. Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, Zheng Z, Yang S, Restifo NP, et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther*. 2011; 19(4):751-9.

[00180] 19. Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar SP, Zhang L, Morgan RA, Restifo NP, et al. Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin Cancer Res*. 2012;18(6):1672-83.

SEQUENCE LISTING

<110> HaemoLogiX Pty. Ltd.

Micklethwaite, Kenneth

Dunn, Rosanne

Gottlieb, David

Logan, Grant

Harrison, Simon

<120> KAPPA MYELOMA ANTIGEN CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS AND USES THEREOF

<130> HMLX-002/02WO 324961-2004

<150> US 62/151,968

<151> 2015-04-23

<150> US 62/158,407

<151> 2015-05-07

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human monoclonal antibody heavy chain

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 5 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 10 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ile Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 15 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 20 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 25 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 30 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 35 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 40 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 45 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 5 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 10 Lys
 <210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> human monoclonal antibody light chain
 <400> 2
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 20 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 25 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 30 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 35 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 40 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 45 210
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> human monoclonal antibody VH CDR
 <400> 3
 5 Asp Thr Tyr Met His
 1 5
 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> human monoclonal antibody VH CDR
 <400> 4
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 15 1 5 10 15
 Gly
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> human monoclonal antibody VH CDR
 <400> 5
 Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Gly Asp Tyr
 25 1 5 10
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> human monoclonal antibody VL CDR
 <400> 6
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10
 35 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> human monoclonal antibody VL CDR
 <400> 7
 Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5
 <210> 8
 45 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> human monoclonal antibody VL CDR
 <400> 8
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 5 <210> 9
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 10 <223> human monoclonal antibody VH
 <400> 9
 gaggtgcagc tgcagcagtc aggggscggag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
 tcctgtacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgacacct cgaatggtaa cactaaatat 180
 15 gacccgaagt tccagggcaa ggccactata atagcagaca catcctccaa cacagcctac 240
 ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc taggggggtc 300
 taccatgatt acgacgggga ctactggggc caagggacca cgctcaccgt ctctcc 357
 <210> 10
 <211> 321
 20 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> human monoclonal antibody VL
 <400> 10
 25 gacatcgta tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 gtcacctgca aggccagtc gaatgtgggt actaatgtag cctggatatca acagaaacca 120
 gggcaatctc cttaaagcact gatttactcg acatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccacagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcgagggg 300
 30 gggaccaagc tggaaataaa g 321
 <210> 11
 <211> 1200
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> human monoclonal antibody VH DNA in pHCMV-Gamml-neo expression
 vector
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (11)..(11)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (947)..(947)
 45 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (998)..(998)

<223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1009)..(1009)
 5 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1027)..(1027)
 <223> n is a, c, g, or t
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1032)..(1032)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1036)..(1036)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1044)..(1044)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1065)..(1065)
 25 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1085)..(1085)
 <223> n is a, c, g, or t
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1095)..(1095)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (1099)..(1100)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1105)..(1105)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1108)..(1108)
 45 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1111)..(1111)

```

<223> n is a, c, g, or t
<220>
<221> misc_feature
<222> (1127)..(1127)
5 <223> n is a, c, g, or t
<220>
<221> misc_feature
<222> (1134)..(1134)
<223> n is a, c, g, or t
10 <220>
<221> misc_feature
<222> (1136)..(1136)
<223> n is a, c, g, or t
<220>
15 <221> misc_feature
<222> (1157)..(1157)
<223> n is a, c, g, or t
<220>
<221> misc_feature
20 <222> (1168)..(1168)
<223> n is a, c, g, or t
<220>
<221> misc_feature
<222> (1172)..(1172)
25 <223> n is a, c, g, or t
<220>
<221> misc_feature
<222> (1190)..(1190)
<223> n is a, c, g, or t
30 <400> 11
caggacgatc ngcctccgca agcttatgaa tatgcaaadc ctctgaatct acatggtaaa 60
tataggtttg tctataccac aaacagaaaa acatgagatc acagttctct ctacagttac 120
tgagcacaca ggacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag 180
ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggtctgg acatatatat ggggtgacaat 240
35 gacatccact ttgcctttct ctccacaggt gtgcactccg aggtgcagct gcagcagtca 300
ggggcgagc ttgtgaagcc aggggcctca gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc 360
aacattaaag acacctatat gcaactgggtg aagcagaggc ctgaacaggg cctggagtgg 420
attggaagga ttgatcctgc gaatggtaac actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag 480
gccactataa tagcagacac atcctccaac acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca 540
40 tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct aggggggtct accatgatta cgacggggac 600
tactggggcc aagggaccac gctcaccgtc tcctccggtg agtggatccc aagctagctt 660
tctggggcag gccaggcctg accttggtt tggggcaggg aggggggctaa ggtgaggcag 720
gtggcgccag ccagggtgcac acccaatgcc catgagccca gacactggac gctgaacctc 780
gcgacagtt aagaaccag gggcctctgc gccctgggac cagctctgtc ccacaccgag 840
45 gtcacatggc accacctctc ttgcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc 900
accctcctc caagagcacc tctgggggca cagcgccct gggctgncct ggtcaaggac 960
tacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcangc gccctgacna gcgggggtgca 1020
caccttnccg gntgtntctac agtnctcagg actctactcc ctcanacagc tggtgaccgt 1080

```

gcccntcagc agctnggggn cccanacnta natttgcacg ggaatcnaag cccngnaacc 1140
 caaggggaaa aaaaaanttg gtgaaagncc cnccaggag ggaggggttn tgctggaaac 1200

<210> 12

<211> 1121

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human monoclonal antibody VL DNA in pHCMV-Gamm1-neo expression
 vector

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (983)..(983)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1002)..(1003)

25 <223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1014)..(1014)

<223> n is a, c, g, or t

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (1055)..(1055)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (1057)..(1057)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

40 <222> (1084)..(1084)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1092)..(1092)

45 <223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1098)..(1098)

<223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1110)..(1110)
 5 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1113)..(1113)
 <223> n is a, c, g, or t
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1119)..(1119)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1121)..(1121)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 12

 ncaggggcgat cngcctccgc aagcttatga atatgcaa at cctctgaatc tacatggtaa 60
 20 atataggttt gtctatacca caaacagaaa aacatgagat cacagttctc tctacagtta 120
 ctgagcacac aggacctcac catgggatgg agctgtatca tcctcttctt ggtagcaaca 180
 gctacaggta aggggctcac agtagcaggc ttgaggctctg gacatatata tgggtgacaa 240
 tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtgcaactcc gacatcgtca tgaccagtc 300
 tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc gtcacctgca aggccagtc 360
 25 gaatgtgggt actaatgtag cctggtatca acagaaacca gggcaatctc ctaaagcact 420
 gatttactcg acatcctacc ggtacagtgg agtccctgat cgcttcacag gcagtggatc 480
 tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct gaagacttgg cagagtattt 540
 ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg gggaccaagc tggaaataaa 600
 ggggtgagtgg atcctagaat tctaaactct gagggggtcg gatgacgtgg ccattctttg 660
 30 cctaaagcat tgagtttact gcaaggctcag aaaagcatgc aaagccctca gaatggctgc 720
 aaagagctcc aacaaaacaa tttagaactt tattaaggaa tagggggaag ctaggaagaa 780
 actcaaaaca tcaagatttt aaatacgctt cttggtctcc ttgctataat tatctgggat 840
 aagcatgctg ttttctgtct gtccctaaca tgccctgtga ttatccgcaa acaacacacc 900
 caagggcaga actttgttac ttaaacacca tcctgtttgc ttctttcctc aggaactgtg 960
 35 gctgcaccat ctgtcttcat ctncgccga tctgatgagc anntgaaatc tggnaactgc 1020
 ctctgttgtg tgctgtctga aaaacttcta tccnanaagg ccaaagtaca gtggaagggg 1080
 aaanccccct cnatcggnaa ctccccgaan ggncccganc n 1121
 <210> 13
 <211> 15
 40 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> human monoclonal antibody VH CDR
 <400> 13
 45 gacacctata tgcac 15
 <210> 14
 <211> 51
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> human monoclonal antibody VH CDR
 <400> 14
 5 aggattgatc ctgcgaatgg taacactaaa tatgacccga agttccaggg c 51
 <210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> human monoclonal antibody VH CDR
 <400> 15
 ggggtctacc atgattacga cggggactac 30
 <210> 16
 15 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> human monoclonal antibody VL CDR
 20 <400> 16
 aaggccagtc agaatgtggg tactaatgta gcc 33
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> human monoclonal antibody VL CDR
 <400> 17
 tcgacatcct accggtacag t 21
 30 <210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> human monoclonal antibody VL CDR
 <400> 18
 cagcaatata acagctatcc gtacacg 27
 <210> 19
 <211> 530
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Flexi-IL12
 <400> 19
 45 Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
50 55 60

5 Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
10 100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
130 135 140

15 Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
20 180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210 215 220

25 Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
30 260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300

35 Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
325 330 335

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp
40 340 345 350

Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala
355 360 365

Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro
370 375 380

45 Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr
385 390 395 400

Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser
405 410 415

Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu
420 425 430
Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile
435 440 445
5 Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala
450 455 460
Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met
465 470 475 480
Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu
10 485 490 495
Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Ala
500 505 510
Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn
515 520 525
15 Ala Ser
530
<210> 20
<211> 21
<212> PRT
20 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> IgG heavy chain leader component of KM.CAR-hCH2CH3-28z construct
<400> 20
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
25 1 5 10 15
Val Gln Cys Ser Arg
20
<210> 21
<211> 107
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> KappaMab variable light chain component of KM.CAR-hCH2CH3-28z
construct
35 <400> 21
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30
40 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
45 65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105
 <210> 22
 <211> 125
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> KappaMab variable heavy chain component of KM.CAR-hCH2CH3-28z
 construct
 <400> 22
 10 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 15 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ile Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Tyr Val Thr Val Ser Ser
 25 115 120 125
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> (G4S)3 flexible linker component of KM.CAR-hCH2CH3-28z construct
 <400> 23
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 35 <210> 24
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> Hinge, CH2 and CH3 components of KM.CAR-hCH2CH3-28z construct
 <400> 24
 Tyr Val Thr Val Ser Ser Gln Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp
 1 5 10 15
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 45 20 25 30
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 35 40 45
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

50 55 60
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 65 70 75 80
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 5 85 90 95
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 100 105 110
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 115 120 125
 10 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 130 135 140
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 145 150 155 160
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 15 165 170 175
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 180 185 190
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 195 200 205
 20 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 210 215 220
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 225 230 235 240
 Gly Lys Lys Asp Pro Lys
 25 245
 <210> 25
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 25
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
 20 25 30
 35 Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
 35 40 45
 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
 50 55 60
 Ala Tyr Arg Ser
 40 65
 <210> 26
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 26
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 5 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 10 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110
 <210> 27
 <211> 688
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Full length KM.CAR-hCH2CH3-28z amino acid construct
 <400> 27
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 20 1 5 10 15
 Val Gln Cys Ser Arg Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met
 20 25 30
 Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln
 35 40 45
 25 Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 50 55 60
 Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 30 85 90 95
 Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 35 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 40 165 170 175
 Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 195 200 205
 45 Gly Lys Ala Thr Ile Ile Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240

Arg Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Thr Leu Thr Val Ser Ser Tyr Val Thr Val Ser Ser Gln Asp Pro Ala
260 265 270

5 Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
275 280 285

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
290 295 300

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
10 305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
325 330 335

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
340 345 350

15 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
20 385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
420 425 430

25 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
30 Страница 18

Attachment1
465 470 475 480

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
485 490 495

35 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu
500 505 510

Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val
515 520 525

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
40 530 535 540

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
545 550 555 560

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
565 570 575

45 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
580 585 590

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
595 600 605

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 610 615 620
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 625 630 635 640
 5 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 645 650 655
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 660 665 670
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 10 675 680 685
 <210> 28
 <211> 2064
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Full length KM.CAR-hCH2CH3-28z nucleic acid construct
 <400> 28
 atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatit taaaagggtg ccagtgtctt 60
 agagacatcg tcatgaccca gtctcaaaaa ttcattgtcca catcagtagg agacagggtc 120
 20 agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180
 ccagggcaat ctcttaaagc actgatttac tgcacatcct accggtacag tggagtccct 240
 gatcgcttca caggcagtggt atctgggaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag 300
 tctgaagact tggcagagta tttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
 gggggggacca agctggaaat aaagggtggc ggtgggtcgg gcggtgggtg gtcgggtggc 420
 25 ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtcg ggggcggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
 gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
 aagcagaggc ctgaacaggc cctggagtgg attggaagga ttgacatcgc gaatggtaac 600
 actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag gccactataa tagcagacac atcctccaac 660
 acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct 720
 30 aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aaggggaccac gctcacgctc 780
 tcctcctacg tcaccgtctc ttcacaggat cccgccgagc ccaaactctc tgacaaaact 840
 cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt ctctctcttc 900
 ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg 960
 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1020
 35 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtgggtc 1080
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1140
 tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1200
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1260
 agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1320
 40 aatgggcaac cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1380
 ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1440
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1500
 tctccgggta aaaaagatcc caaatTTTgg gtgctgggtg tggttgggtg agtccctggct 1560
 tgctatagct tgctagtaac agtggccttt attattttct gggtgaggag taagaggagc 1620
 45 aggtcctctg acagtgacta catgaacatg actccccgcc gccccgggcc caccgcgaag 1680
 cattaccagc cctatgcccc accacgcgac ttcgcagcct atcgtctccag agtgaagtcc 1740
 agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc 1800
 aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag 1860

atgggggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa 1920
gataagatgg cggagggccta cagtgcagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag 1980
gggcacgatg gcctttacca ggggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt 2040
cacatgcagg ccctgcccc cgc 2064

5 <210> 29

<211> 1727

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Full length KM.CAR-hCH3-28z nucleic acid construct

<400> 29

tggagtttgg gctgagctgg ctttttcttg tggctatattt aaaaggtgtc cagtgcctcta 60
gagacatcgt catgaccag tctcaaaaat tcatgtccac atcagtagga gacaggggtca 120
gcgtcacctg caaggccagt cagaatgtgg gtactaatgt agcctgggtat caacagaaac 180
15 cagggcaatc tcctaaagca ctgatttact cgacatccta ccggtacagt ggagtcctctg 240
atcgcttcac aggcagtggg tctgggacag atttctactt caccatcagc aatgtgcagt 300
ctgaagactt ggcagagtat ttctgtcagc aatataacag ctatccgtac acgttcggag 360
gggggaccaa gctggaaata aagggtggcg gtggctcggg cgggtggggg tcgggtggcg 420
gcggatctga ggtgcagctg cagcagtcag gggcgagct tgtgaagcca ggggcctcag 480
20 tcaagttgtc ctgtacagct tctggcttca acattaaaga cacctatatg cactgggtga 540
agcagaggcc tgaacaggc ctggagtggg ttggaaggat tgatcctgcg aatggtaaca 600
ctaaatatga cccgaagtgc cagggcaagg ccactataat agcagacaca tcctccaaca 660
cagcctacct gcagctcagc agcctgacat ctgaggacac tgccgtctat tactgtgcta 720
gggggggtcta ccatgattac gacggggact actggggcca agggaccacg ctcaccgtct 780
25 cctccggtgg aggcgggtct gggggcgag gttcaggcgg ggggtggttc gagcccaaat 840
ctcctgacaa aactcacaca tgcccagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc 900
ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct 960
tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca 1020
agaccacgcc tcccgtgctg gactccgagc gctccttctt cctctacagc aagctcaccg 1080
30 tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc 1140
tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaattt tgggtgctgg 1200
tgggtggttg tggagtccctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc tttattattt 1260
tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac atgactcccc 1320
gccgccccgg gccacccgc aagcattacc agccctatgc cccaccacgc gacttcgcag 1380
35 cctatcgctc cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac cagcagggcc 1440
agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca 1500
agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag 1560
gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcgaggc ctacagtga attgggatga 1620
aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca 1680
40 ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgccc ccctcgc 1727

<210> 30

<211> 1407

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

45 <223> Full length KM.CAR-h-28z nucleic acid construct

<400> 30

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgcctc 60

```

agagacatcg tcatgaccca gtctcaaaaa ttcattgtcca catcagtagg agacaggggtc 120
agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180
ccagggaat ctctaaagc actgatttac tgcacatcct accggtacag tggagtccct 240
gatcgcttca caggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag 300
5 tctgaagact tggcagagta tttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat aaaggggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtca ggggcggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
aagcagaggc ctgaacaggc cctggagtgg attggaagga ttgacctgc gaatggtaac 600
10 actaaatatg acccgaagtt ccagggaag gccactataa tagcagacac atctccaac 660
acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct 720
aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gtcaccgtc 780
tcctccggtg gaggcgggtc tggggcgga ggttcaggcg ggggtggttc cgagcccaa 840
tctcctgaca aaactcacac atgcccattt tgggtgctgg tgggtggtgg tggagtctg 900
15 gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc tttattattt tctgggtgag gagtaagagg 960
agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac atgactcccc gccgccccgg gccaccgc 1020
aagcattacc agccctatgc cccaccacgc gacttcgcag cctatcgctc cagagtgaag 1080
ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag 1140
ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggacct 1200
20 gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 1260
aaagataaga tggcggaggc ctacagtga attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc 1320
aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 1380
cttcacatgc aggccctgcc ccctcgc 1407
<210> 31
25 <211> 1461
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Full length KM.CAR-CD8a-28z nucleic acid construct
30 <400> 31
atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatth taaaagggtg ccagtgtctc 60
agagacatcg tcatgaccca gtctcaaaaa ttcattgtcca catcagtagg agacaggggtc 120
agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180
ccagggaat ctctaaagc actgatttac tgcacatcct accggtacag tggagtccct 240
35 gatcgcttca caggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag 300
tctgaagact tggcagagta tttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat aaaggggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtca ggggcggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
40 aagcagaggc ctgaacaggc cctggagtgg attggaagga ttgacctgc gaatggtaac 600
actaaatatg acccgaagtt ccagggaag gccactataa tagcagacac atctccaac 660
acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct 720
aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gtcaccgtc 780
tcctccacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cggccaccat cgcgtcgag 840
45 cccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg ccagcgccgg ggggcgcagt gcacacgagg 900
gggctggact tcgcctgtga tttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 960
tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 1020
ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact ccccgccgcc ccgggccac ccgcaagcat 1080

```

taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1140
aggagcgcag acgccccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1200
ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1260
gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1320
5 aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1380
cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1440
atgcaggccc tgccccctcg c 1461
<210> 32
<211> 1410
10 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Full length KM.CAR-h-28TM-41BBz nucleic acid construct
<400> 32
15 atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatct taaaagggtg ccagtgcctc 60
agagacatcg tcatgaccca gtctcaaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggtc 120
agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180
ccagggcaat ctctaaagc actgatttac tcgacatcct accggtacag tggagtccct 240
gatcgcttca caggcagtggt atctgggaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag 300
20 tctgaagact tggcagagta tttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat aaagggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtca ggggcggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
aagcagaggc ctgaacaggg cctggagtgg attggaagga ttgatcctgc gaatggtaac 600
25 actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag gccactataa tagcagacac atcctccaac 660
acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct 720
aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gtcaccgtc 780
tcctccggtg gaggcgggtc tgggggcgga ggttcaggcg ggggtggttc cgagcccaaa 840
tctcctgaca aaactcacac atgcccattt tgggtgctgg tgggtggttg tggagtccct 900
30 gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc tttattattt tctgggtgaa acggggcaga 960
aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca ttatgagac cagtacaaac tactcaagag 1020
gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg 1080
aagttcagca ggagcgcaga cgcgcccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac 1140
gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgtttttg acaagagacg tggccgggac 1200
35 cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg 1260
cagaaagata agatggcgga ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg 1320
ggcaagggggc acgatggcct ttaccagggg tctcagtacag ccaccaagga cacctacgac 1380
gcccttcaca tgcaggccct gccccctcgc 1410
<210> 33
40 <211> 1464
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Full length KM.CAR_8a_28TM_41BBz nucleic acid construct
45 <400> 33
atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatct taaaagggtg ccagtgcctc 60
agagacatcg tcatgaccca gtctcaaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggtc 120
agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180

```

ccagggcaat ctcctaaagc actgatttac tgcacatcct accggtacag tggagtcctt 240
gatcgcttca caggcagtggt atctgggaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag 300
tctgaagact tggcagagta tttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat aaagggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
5 ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtc ggggcggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
aagcagagggc ctgaacaggg cctggagtggt attggaagga ttgatcctgc gaatggtaac 600
actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag gccactataa tagcagacac atcctccaac 660
acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct 720
10 aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gtcaccgctc 780
tcctccacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag 840
ccccgtccc tgcgccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg 900
gggctggact tcgcctgtga tttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 960
tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaaacgggg cagaaagaaa 1020
15 ctctgtata tattcaaaca accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat 1080
ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc 1140
agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc 1200
aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag 1260
atggggggaa agccgagaag gaagaacctt caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa 1320
20 gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag 1380
gggcacgatg gcctttacca ggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt 1440
cacatgcagg ccctgcccc tcgc 1464
<210> 34
<211> 2067
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Full length KM.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz nucleic acid construct
<400> 34
30 atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtgt ccagtgtctt 60
agagacatcg tcatgacca gtctcaaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggtc 120
agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180
ccagggcaat ctcctaaagc actgatttac tgcacatcct accggtacag tggagtcctt 240
gatcgcttca caggcagtggt atctgggaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag 300
35 tctgaagact tggcagagta tttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat aaagggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtc ggggcggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
aagcagagggc ctgaacaggg cctggagtggt attggaagga ttgatcctgc gaatggtaac 600
40 actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag gccactataa tagcagacac atcctccaac 660
acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct 720
aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gtcaccgctc 780
tcctccggtg gaggcgggtc tgggggcgga ggttcaggcg ggggtggttc cgagcccaaa 840
tctcctgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctccagtcgc gggaccgtca 900
45 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tcgcccggac ccctgaggtc 960
acatgcgtgg tgggtgaacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 1020
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta cgccagcacg 1080
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1140

```

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1200
aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1260
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1320
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1380
5 tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1440
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacacagaag 1500
agcctctccc tgtctccggg taaattttgg gtgctgggtg tggttgggtg agtcctggct 1560
tgctatagct tgctagtaac agtggccttt attattttct gggtgaaacg gggcagaaag 1620
aaactcctgt atatatcaa acaaccattt atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa 1680
10 gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag 1740
ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag 1800
ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct 1860
gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 1920
aaagataaga tggcggaggc ctacagtga attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc 1980
15 aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 2040
cttcacatgc aggccttgcc ccctcgc 2067
<210> 35
<211> 30
<212> DNA
20 <213> Homo sapiens
<400> 35
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 30
<210> 36
<211> 114
25 <212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 36
acatTTtgac acccccataa tatttttcca gaattaacag tataaattgc atctcttgtt 60
caagagttcc ctatcactct ctttaatcac tactcacagt aacctcaact cctg 114
30 <210> 37
<211> 1233
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
35 <223> Constructed nucleic acid sequence of transposon gene expression
cassette
<400> 37
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt caattaggag gaaaaactgt ttcatacaga 60
aggcgtcaat taggaggaaa aactgtttca tacagaaggc gtcaattgtc ccatcgaatt 120
40 aggaggaaaa actgtttcat acagaaggcg tcaattagga ggaaaaactg tttcatacag 180
aaggcgtcaa ttaggaggaa aaactgtttc atacagaagg cgtcaattgt cccgggacat 240
tttgacaccc ccataatatt tttccagaat taacagtata aattgcatct cttgttcaag 300
agttccctat cactctcttt aatcactact cacagtaacc tcaactcctg aactccatgg 360
atgggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtgggtg ccatcctggg cgagctggac 420
45 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 480
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 540
ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 600
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 660

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 720
 gtgaaccgca tgcgactgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 780
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 840
 ggcacatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 900
 5 gaccactacc agcagaacac ccccatcgga tccggagcca cgaacttctc tctgttaaag 960
 caagcaggag acgttgaaga aaacccccgt cctatttaaa tcctcgactg tgccttctag 1020
 ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac 1080
 tcccatgctc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 1140
 ttctattctg ggggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 1200
 10 caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggc 1233
 <210> 38
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Mutated SANT-7 amino acid sequence
 <400> 38
 Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
 1 5 10 15
 20 Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
 20 25 30
 Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
 35 40 45
 Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Asp Ile Leu Asp Phe Ile
 25 50 55 60
 Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 65 70 75 80
 Ser Lys Glu Ala Asp Ala Phe Trp Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
 85 90 95
 30 Glu Lys Asp Gly Cys Phe Tyr Lys Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
 100 105 110
 Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
 35 130 135 140
 Met Arg Thr Lys Asp Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
 165 170 175
 40 Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
 180 185 190
 Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Ile Arg Ser Leu Arg Ala
 195 200 205
 Leu Arg Ala Met His His His His His His
 45 210 215
 <210> 39
 <211> 655
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutated SANT-7 nucleic acid sequence

<400> 39

```

5  atgaactcct tctccacaag cgccttcggt ccagttgcct tctccctggg gctgctcctg 60
   gtgttgccctg ctgccttccc tgccccagta ccccaggag aagattccaa agatgtagcc 120
   gccccacaca gacagccact cacgagctca gaacgaattg acaaacaaat tcgggacatc 180
   ctcgacttta tctcagcctt aagaaaaggag acatgtaaca agagtaacat gtgtgagagc 240
   tccaaagagg cagacgcatt ctggaacctg aaccttccaa agatggctga aaaagatgga 300
10  tgctttctaca aaggattcaa tgaggagact tgcctggtga aaatcatcac tggctcttctc 360
   gagtttgagg tatacctaga gtacctccag aacagatttg agagtagtga ggaacaagcc 420
   agagctgtgc agatgcgcac aaaagacctg atccagttcc tgcagaaaaa ggcaaagaat 480
   ctatagtgaa taaccacccc tgacccaacc acaaatgcca gcctgctgac gaagctgcag 540
   gcacagaacc agtggctgca ggacatgaca actcatctca ttctgagatc ttttaaggag 600
15  ttctgatgcc gtagcctgag ggctcttcgg gctatgcac atcaccatca ccact 655

```

<210> 40

<211> 540

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20 <220>

<223> Flexi-IL-12 amino acid construct

<400> 40

```

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
1 5 10 15
25  Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
   20 25 30
   Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
   35 40 45
   Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
30  50 55 60
   Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
   65 70 75 80
   Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
   85 90 95
35  Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
   100 105 110
   Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
   115 120 125
   Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
40  130 135 140
   Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
   145 150 155 160
   Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
   165 170 175
45  Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
   180 185 190
   Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
   195 200 205

```


Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210 215 220
Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
225 230 235 240
5 Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255
Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260 265 270
Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
10 275 280 285
Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300
Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320
15 Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
325 330 335
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp
340 345 350
Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala
20 355 360 365
Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro
370 375 380
Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr
385 390 395 400
25 Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser
405 410 415
Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu
420 425 430
Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile
30 435 440 445
Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala
450 455 460
Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met
465 470 475 480
35 Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu
485 490 495
Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr
500 505 510
Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val
40 515 520 525
Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
530 535 540
<210> 41
<211> 1620
45 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Flexi-IL-12 nucleic acid construct

<400> 41

atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg ttttccctgg tttttctggc atctcccctc 60
 gtggccatat gggaactgaa gaaagatggt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat 120
 gcccttggag aaatggtggt cctcacctgt gacacccctg aagaagatgg tatcacctgg 180
 5 accttggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgaccat ccaagtcaaa 240
 gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaaggag gcgaggttct aagccattcg 300
 ctctgtctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatatttt aaaggaccag 360
 aaagaaccca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgtttc 420
 acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga 480
 10 ggctcttctg acccccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc 540
 agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgcccc 600
 gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atggtggatg ccgttcacaa gctcaagtat 660
 gaaaactaca ccagcagctt cttcatcagg gacatcatca aacctgacct acccaagaac 720
 ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga gtaccctgac 780
 15 acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggcaag 840
 agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc 900
 cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcggggc caggaccgct actatagctc atcttggagc 960
 gaatgggcat ctgtgccctg cagtgggtggc ggtggaagcg gcggtggcgg aagcggcgg 1020
 ggcggcagca gaaacctccc cgtggccact ccagaccagc gaatgttccc atgccttcac 1080
 20 cactcccaaa acctgctgag ggccgtcagc aacatgctcc agaaggccag acaaactcta 1140
 gaattttacc cttgcacttc tgaagagatt gatcatgaag atatcacaaa agataaaacc 1200
 agcacagtgg aggcctgttt accattggaa ttaaccaaga atgagagttg cctaaattcc 1260
 agagagacct ctttcataac taatgggagt tgcctggcct ccagaaagac ctcttttatg 1320
 atggccctgt gccttagtag tatttatgaa gacttgaaga tgtaccaggt ggagttcaag 1380
 25 accatgaatg caaagcttct gatggatcct aagaggcaga tctttctaga tcaaaacatg 1440
 ctggcagtta ttgatgagct gatgcaggcc ctgaatttca acagtgagac tgtgccacaa 1500
 aaatcctccc ttgaagaacc ggatttttat aaaactaaaa tcaagctctg catacttctt 1560
 catgctttca gaattcgggc agtgactatt gatagagtga tgagctatct gaatgcttcc 1620

<210> 42

30 <211> 170

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GAL 3C amino acid construct

35 <400> 42

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Ser Arg His His His His His Gly Ala Pro Ala Gly

20 25 30

40 Pro Leu Ile Val Pro Tyr Asn Leu Pro Leu Pro Gly Gly Val Val Pro

35 40 45

Arg Met Leu Ile Thr Ile Leu Gly Thr Val Lys Pro Asn Ala Asn Arg

50 55 60

Ile Ala Leu Asp Phe Gln Arg Gly Asn Asp Val Ala Phe His Phe Asn

45 65 70 75 80

Pro Arg Phe Asn Glu Asn Asn Arg Arg Val Ile Val Cys Asn Thr Lys

85 90 95

Leu Asp Asn Asn Trp Gly Arg Glu Glu Arg Gln Ser Val Phe Pro Phe

100 105 110
 Glu Ser Gly Lys Pro Phe Lys Ile Gln Val Leu Val Glu Pro Asp His
 115 120 125
 Phe Lys Val Ala Val Asn Asp Ala His Leu Leu Gln Tyr Asn His Arg
 5 130 135 140
 Val Lys Lys Leu Asn Glu Ile Ser Lys Leu Gly Ile Ser Gly Asp Ile
 145 150 155 160
 Asp Leu Thr Ser Ala Ser Tyr Thr Met Ile
 165 170
 10 <210> 43
 <211> 510
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 15 <223> GAL 3C nucleic acid construct
 <400> 43
 atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaagggtgt ccagtgcctct 60
 agacatcatc accatcacca cggcgcccct gctgggccac tgattgtgcc ttataacctg 120
 cctttgcctg ggggagtggt gcctcgcctg ctgataacaa ttctgggcac ggtgaagccc 180
 20 aatgcaaaca gaattgcttt agatttccaa agaggaatg atgttgccctt ccactttaac 240
 ccacgcttca atgagaacaa caggagagtc attgtttgca atacaaagct ggataataac 300
 tggggaaggg aagaaagaca gtcggttttc ccatttgaaa gtgggaaacc attcaaaata 360
 caagtactgg ttgaacctga ccacttcaag gttgcagtga atgatgctca cttgttgacg 420
 tacaatcatc ggggttaaaaa actcaatgaa atcagcaaac tgggaatttc tgggtgacata 480
 25 gacctcacca gtgcttcata taccatgata 510

(57) Формула изобретения

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий один или больше
 внутриклеточных сигнальных доменов и внеклеточный антигенсвязывающий домен,
 30 при этом указанный внеклеточный антигенсвязывающий домен специфически
 связывается с каппа-антигеном миеломы (КМА) и не связывается с легкой цепью каппа
 иммуноглобулина, связанной с тяжелой цепью иммуноглобулина, при этом
 внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит определяющие комплементарность
 участки (CDR), которые содержат последовательности SEQ ID NO: 3–8.
2. Химерный антигенный рецептор по п. 1, в котором указанный один или больше
 35 внутриклеточных сигнальных доменов содержит один или больше костимулирующих
 эндодоменов, при этом указанный один или больше костимулирующих эндодоменов
 представляет собой что-либо одно или больше из домена CD28, домена CD3ζ, домена
 4-1BB, домена OX-40 или их комбинаций.
3. Химерный антигенный рецептор по п. 1 или 2, в котором указанный внеклеточный
 40 связывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который
 специфически связывается с КМА и не связывается с легкой цепью каппа
 иммуноглобулина, связанной с тяжелой цепью иммуноглобулина.
4. Химерный антигенный рецептор по п. 3, в котором указанный scFv содержит VL-
 45 цепь и VH-цепь КарраМаб, при этом VL-цепь содержит SEQ ID NO: 2, а VH-цепь содержит
 SEQ ID NO: 1.
5. Химерный антигенный рецептор по п. 4, в котором указанные VL-цепь и VH-цепь
 КарраМаб соединены глицин-сериновым линкером, при этом указанный глицин-

сериновый линкер содержит (Gly₄Ser)₃.

6. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 3-5, в котором указанный scFv присоединен к одному или больше внутриклеточным сигнальным доменам спейсером, в котором указанный спейсер представляет собой константную область иммуноглобулина или цепь CD8α.

7. Химерный антигенный рецептор по п. 6, в котором указанная константная область иммуноглобулина содержит что-либо одно или больше из шарнирного домена IgG, CH2-домена IgG и CH3-домена IgG.

8. Химерный антигенный рецептор по п. 6 или 7, в котором указанная константная область иммуноглобулина содержит комбинацию из шарнирного домена иммуноглобулина, CH2-домена IgG и CH3-домена IgG с последовательностью SEQ ID NO: 24.

9. Химерный антигенный рецептор по любому из пп. 6-8, в котором указанный спейсер присоединен к scFV глицин-сериновым линкером, в котором указанный глицин-сериновый линкер содержит (Gly₄Ser)₃.

10. Генетически модифицированная Т-клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор по любому из пп. 1-9, при этом Т-клетка уничтожает клетки КМА-экспрессирующего злокачественного новообразования.

11. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 10, которая дополнительно экспрессирует одну или больше дополнительных биологических молекул, причем указанная одна или больше дополнительных биологических молекул содержит что-либо одно или больше из ИЛ-12, галектина-3С (GAL3C), SANT7 или связывающего фактора роста гепатоцитов (ФРГ) белка.

12. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 11, при этом указанная одна или больше дополнительных биологических молекул представляет собой ИЛ-12, и указанный ИЛ-12 экспрессируется одноцепочечным полипептидом, содержащим одну субъединицу р35 ИЛ-12 и одну субъединицу р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, при этом указанный гибкий линкер представляет собой линкер (G₄S)₃.

13. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 12, при этом указанный одноцепочечный полипептид, содержащий одну субъединицу р35 ИЛ-12 и одну субъединицу р40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, образует биоактивный гетеродимер р70 ИЛ-12.

14. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 11, которая дополнительно экспрессирует одну или больше дополнительных биологических молекул и селектируемый маркер.

15. Способ получения генетически модифицированной Т-клетки по любому из пп. 10-14, при этом способ включает введение в Т-клетку экспрессионного вектора, кодирующего CAR, содержащий один или больше внутриклеточных сигнальных доменов и внеклеточных антигенсвязывающих доменов, при этом указанный внеклеточный антигенсвязывающий домен специфически связывается с каппа-антигеном миеломы (КМА) и не связывается с легкой цепью каппа иммуноглобулина, связанной с тяжелой цепью иммуноглобулина.

16. Способ по п. 15, в котором указанный экспрессионный вектор представляет собой экспрессионную систему на основе транспозируемого вектора.

17. Применение генетически модифицированных Т-клеток по любому из пп. 10-14 в производстве лекарственного препарата для лечения КМА-экспрессирующего злокачественного новообразования у субъекта.

18. Применение по п. 17, в котором лекарственный препарат содержит один или больше фармацевтически активных агентов, при этом один или больше фармацевтически активных агентов содержат один или больше химиотерапевтических агентов, иммуномодулирующих лекарственных средств или ингибиторов гистондеацетилазы.

5 19. Применение по п. 17 или 18, в котором указанное КМА-экспрессирующее злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ) или амилоидоз.

10 20. Применение по любому из пп. 17-19, в котором генетически модифицированные Т-клетки получены из организма субъекта.

15

20

25

30

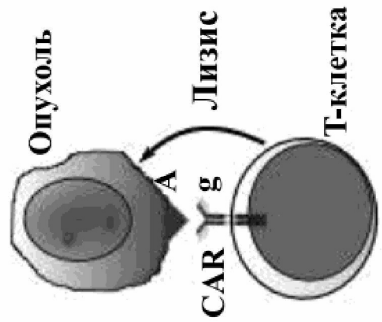
35

40

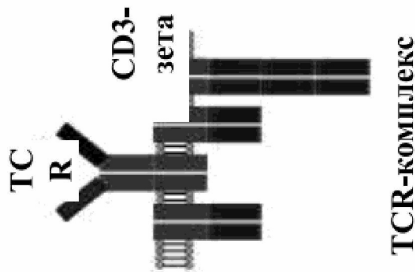
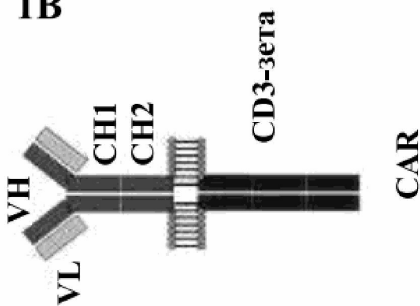
45

1

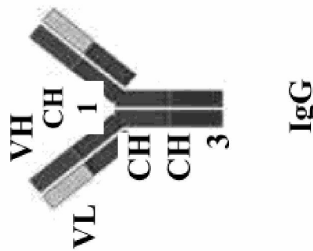
1/12



Фиг. 1В

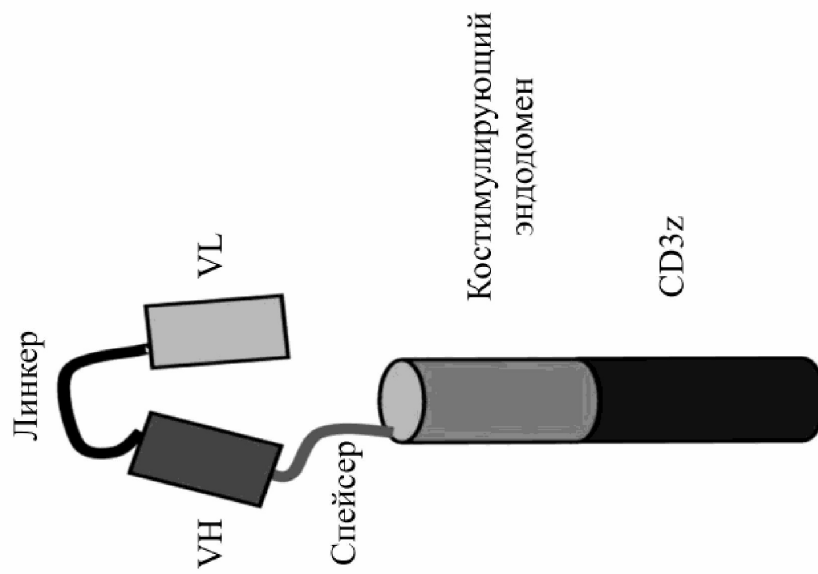


Фиг. 1А



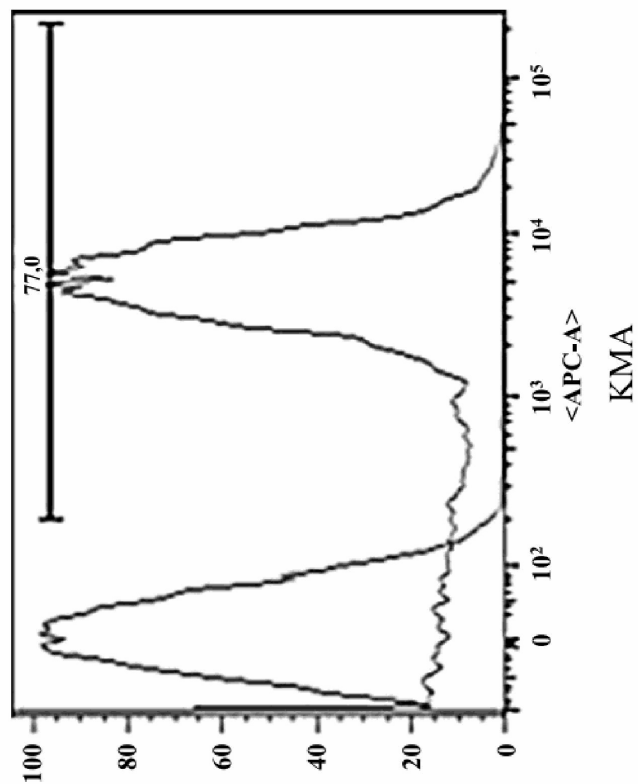
2

2/12

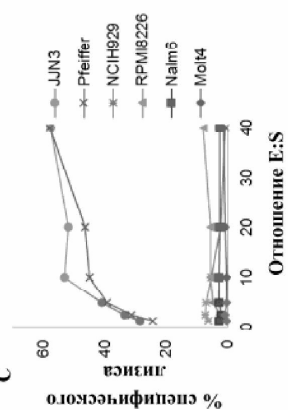


Фиг. 2

3/12



Фиг. 3



Фиг. 4С



Фиг. 6А

scFv	hCH2CH3	CD28	CD3z
------	---------	------	------

Фиг. 6В

scFv	hCH3	CD28	CD3z
------	------	------	------

Фиг. 6С

scFv	h	CD28	CD3z
------	---	------	------

scFv	opti	4-1BB	CD3z
------	------	-------	------

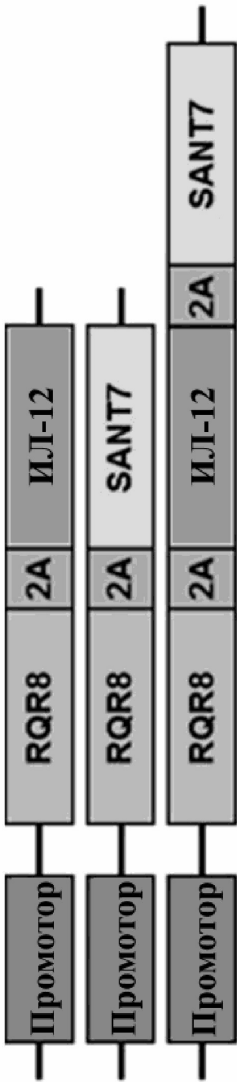
scFv	opti	OX-40	CD3z
------	------	-------	------

scFv	opti	CD28	OX-40	CD3z
------	------	------	-------	------

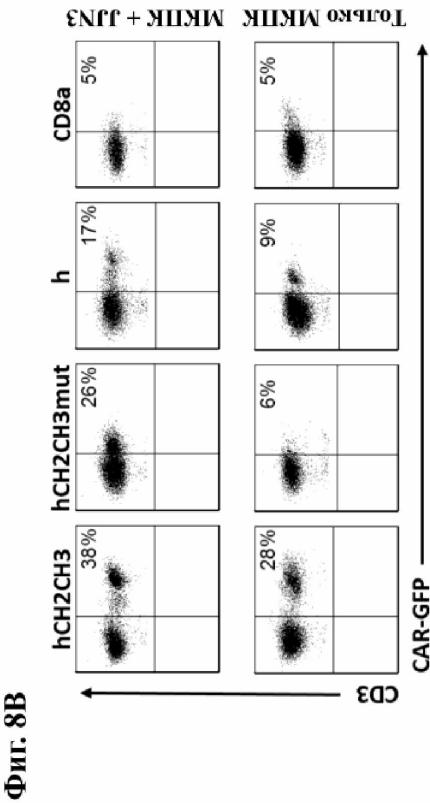
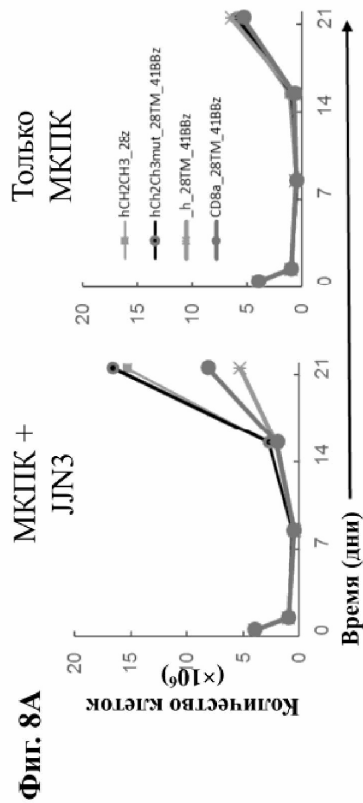
scFv	opti	CD28	4-1BB	CD3z
------	------	------	-------	------

scFv	opti	4-1BB	OX-40	CD3z
------	------	-------	-------	------

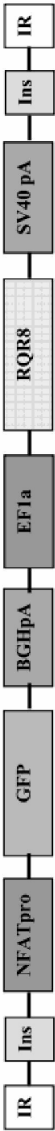
7/12



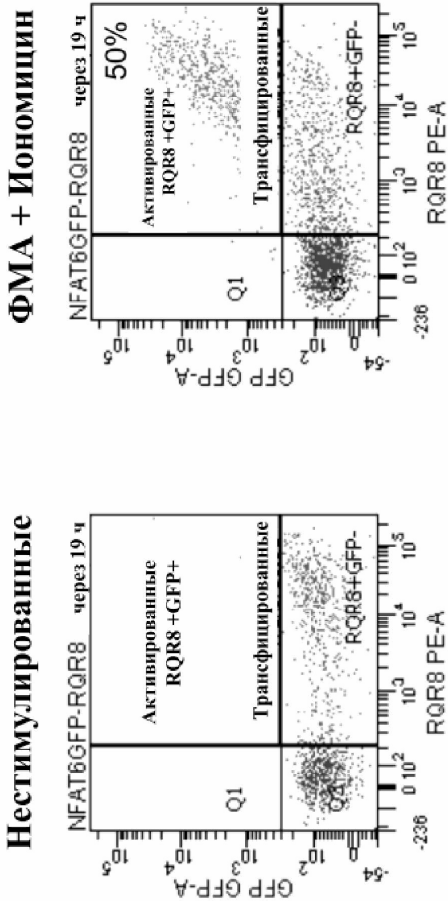
Фиг. 7



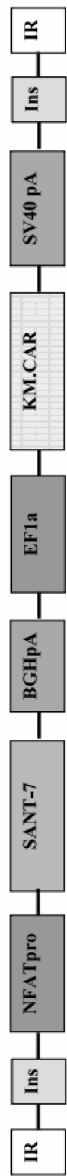
Фиг. 9



Фиг. 10

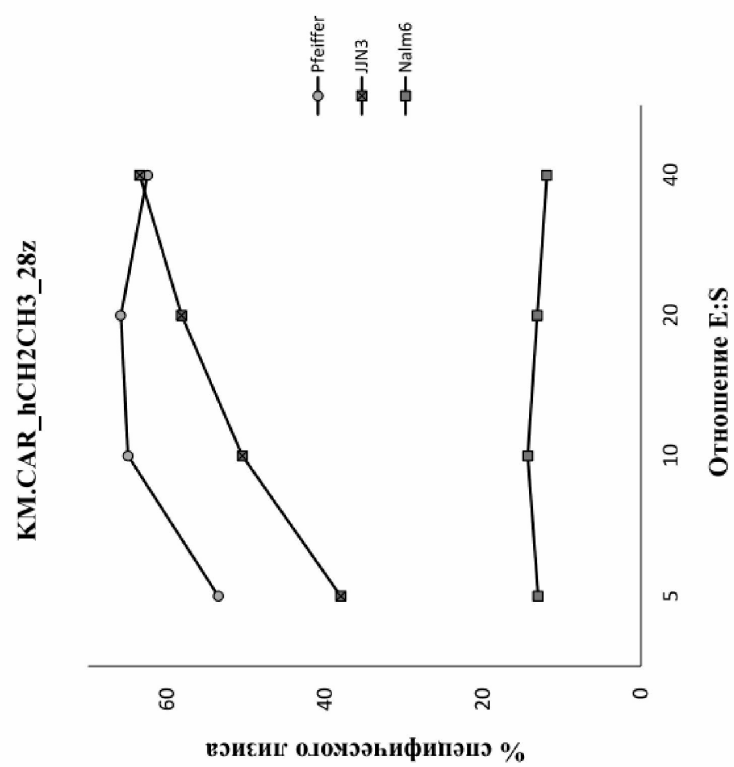


10/12



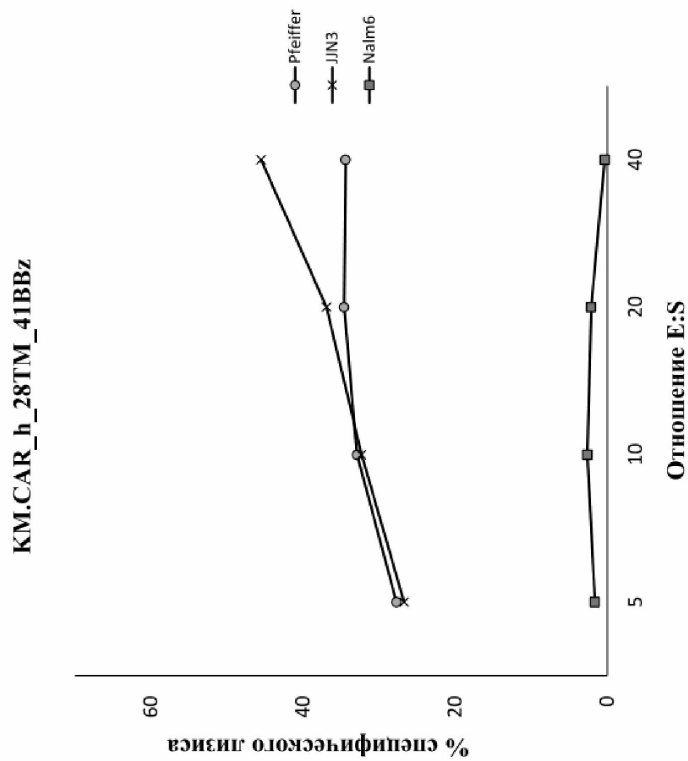
Фиг. 11

11/12



Фиг. 12А

12/12



Фиг. 12В