



(51) МПК
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)

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"

(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-антителу миеломы (КМА), генетически модифицированная Т-клетка, способ получения генетически модифицированной Т-

(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.)

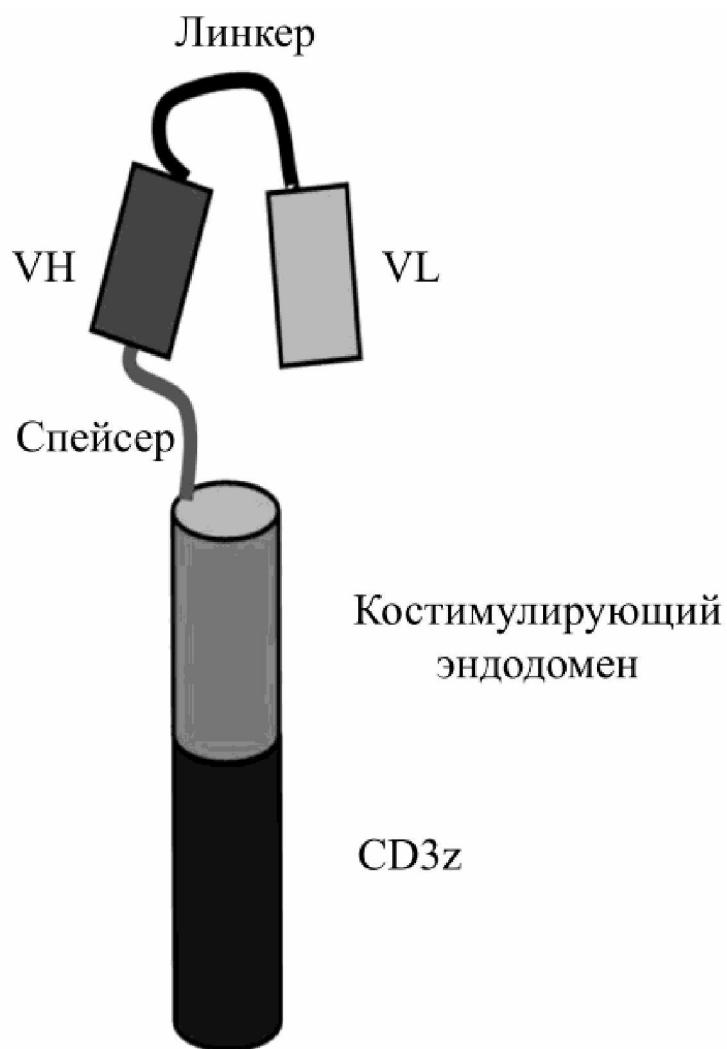
RU 2743188 C2

RU 2743188 C2

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.

R U 2 7 4 3 1 8 8 C 2

C 2
8 1 3 4 7 2 R U



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.

R U 2 7 4 3 1 8 8	<p>RUSSIAN FEDERATION</p>  <p>FEDERAL SERVICE FOR INTELLECTUAL PROPERTY</p>	<p>(19) RU (11) 2 743 188⁽¹³⁾ C2</p> <p>(51) Int. Cl. <i>C07K 14/725</i> (2006.01) <i>C07K 19/00</i> (2006.01) <i>C12N 5/0783</i> (2010.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p>
		<p>(12) ABSTRACT OF INVENTION</p> <hr/> <p>(52) CPC <i>A61K 35/17</i> (2020.08); <i>A61K 38/204</i> (2020.08); <i>A61K 39/395</i> (2020.08); <i>C07K 14/5412</i> (2020.08); <i>C07K 14/5434</i> (2020.08); <i>C07K 14/7051</i> (2020.08); <i>C07K 14/70521</i> (2020.08); <i>C07K 16/2887</i> (2020.08); <i>C07K 16/2896</i> (2020.08); <i>C07K 16/30</i> (2020.08); <i>C12N 5/0636</i> (2020.08); <i>A61K 2039/505</i> (2020.08); <i>C07K 2317/53</i> (2020.08); <i>C07K 2317/56</i> (2020.08); <i>C07K 2319/035</i> (2020.08); <i>C12N 2510/00</i> (2020.08)</p> <hr/>
	<p>(21)(22) Application: 2017138528, 25.04.2016</p> <p>(24) Effective date for property rights: 25.04.2016</p> <p>Registration date: 16.02.2021</p> <p>Priority:</p> <p>(30) Convention priority: 23.04.2015 US 62/151,968; 07.05.2015 US 62/158,407</p> <p>(43) Application published: 07.05.2019 Bull. № 13</p> <p>(45) Date of publication: 16.02.2021 Bull. № 5</p> <p>(85) Commencement of national phase: 07.11.2017</p> <p>(86) PCT application: US 2016/029203 (25.04.2016)</p> <p>(87) PCT publication: WO 2016/172703 (27.10.2016)</p> <p>Mail address: 123242, Moskva, pl. Kudrinskaya, d. 1, a/ya 35, "Mikhailyuk, Sorokolat i partnery - patentnye poverennye"</p>	<p>(72) Inventor(s): MICKLETHWAITE, Kenneth (AU), DUNN, Rosanne (AU), GOTTLIEB, David (AU), LOGAN, Grant (AU)</p> <p>(73) Proprietor(s): HAEMALOGIX PTY. LTD. (AU)</p>
		R U 2 7 4 3 1 8 8

(54) CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS TO MYELOMA KAPPA ANTIGEN AND VERSIONS OF THEIR APPLICATION

(57) Abstract:

FIELD: immunology.

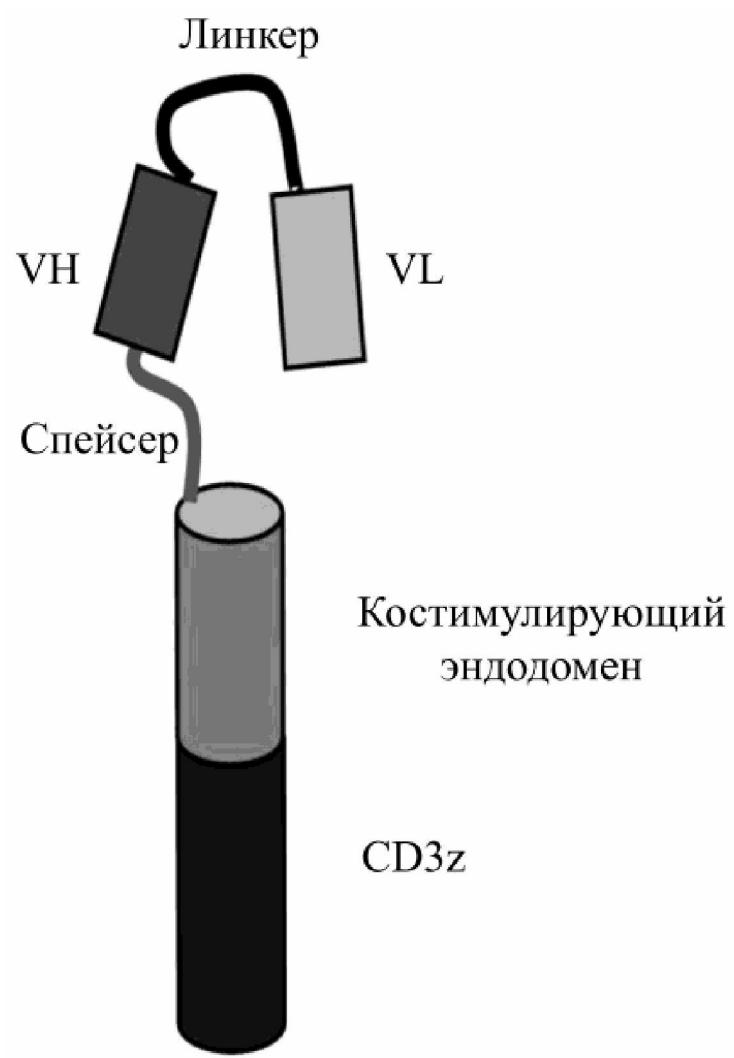
SUBSTANCE: what is presented is a chimeric antigenic receptor for myeloma kappa antigen (KMA), a genetically modified T cell, a method for producing a genetically modified T cell, using a genetically

modified T cell.

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

20 cl, 23 dwg, 5 ex

R U 2 7 4 3 1 8 8 C 2



Фиг. 2

R U 2 7 4 3 1 8 8 C 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 инвалидацией, 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-антитела миеломы (КМА) в большой степени ограничена множественной миеломой и В-клеточными злокачественными новообразованиями. КаппаMab 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-T-клетки) представляют собой возможное решение указанной проблемы. CAR-T-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-T-клетки обладают некоторыми 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-T-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

- 5 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
- 10 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-T-клетки для экспрессии внеклеточного
- 15 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),

- 20 специфическим в отношении каппа-антитела 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-T-клетки способны опосредовать направленный
- 25 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-антитело 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 35 из домена CD28, домена CD3ζ, домена 4-1BB или домена OX-40, или их комбинаций. В одном варианте реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3ζ и домен CD28. В другом варианте реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3ζ и домен OX-40. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше 40 костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3ζ, домен CD28 и домен OX-40. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3ζ и домен 4-1BB. Согласно еще одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3ζ, домен CD28 и домен 4-1BB. Согласно еще 45 одному варианту реализации указанный один или больше костимулирующих эндодоменов CAR содержит домен CD3ζ, 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 КappaMab. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит участки CDR VL (CDR вариабельной области легкой цепи) последовательностей SEQ ID NO: 6-8. Согласно 5 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 вариабельной 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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 40 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-T-клетки). В одном варианте реализации указанные CAR-T-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-антитела 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-3C (GAL3C). В одном варианте реализации указанные CAR-

5 Т-клетки экспрессируют одноцепочечный полипептид, содержащий одну субъединицу p35 ИЛ-12 и одну субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером. В одном варианте реализации указанный ИЛ-12 p35 и ИЛ-12 p40 соединены (G₄S)₃-линкером.

В одном варианте реализации указанный одноцепочечный полипептид ИЛ-12 образует биоактивный гетеродимер p70 ИЛ-12. В одном варианте реализации указанная CAR-

10 Т-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

15 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 SANT7 и селективный маркер. В одном варианте

20 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.

25 [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.

30 [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

35 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

40 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

45 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 CD3ζ, 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 вариабельный фрагмент (scFv), который специфически распознает КМА. Согласно еще одному варианту реализации указанный scFv содержит определяющие комплементарность участки (участки CDR), происходящие из КараMab. 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 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$. В одном варианте реализации указанный $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 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 p35 ИЛ-12 и одну субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером. В одном варианте реализации указанные p35 ИЛ-12 и p40 ИЛ-12 соединены $(\text{G}_4\text{S})_3$ -линкером. В одном варианте реализации указанная последовательность, кодирующая одноцепочечный полипептид ИЛ-12, кодирует биоактивный гетеродимер p70 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 p35 ИЛ-12 и p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, и селективный маркер, соединенный с одноцепочечным ИЛ-12 элементом «рибосомального перепрыгивания» 2A. 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» 2A. 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» 2A, и указанная последовательность, кодирующая SANT7, соединена с последовательностью, кодирующей ИЛ-12, дополнительным элементом «рибосомального перепрыгивания» 2A. 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» 2A, и указанная последовательность, кодирующая SANT7, соединена с последовательностью, кодирующей GAL3C, дополнительным элементом «рибосомального перепрыгивания» 2A. 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» 2A, и указанная последовательность, кодирующая GAL3C, соединена с последовательностью, кодирующей ИЛ-12, дополнительным элементом «рибосомального перепрыгивания» 2A. 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» 2A.

[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 (ДВКЛ) или амилоидоз. Согласно конкретному варианту реализации указанный способ включает введение субъекту с множественной миеломой, макроглобулинемией Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ), амилоидозом или другим В-клеточным злокачественным новообразованием, экспрессирующими 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
- 30 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 вариабельный фрагмент (scFv), который специфически распознает КМА. Согласно еще
- 35 одному варианту реализации указанный scFv содержит определяющие комплементарность участки (участки CDR), происходящие из КappaMab. 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

25 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 другом варианте реализации указанные генетически модифицированные Т-клетки сконструированы с дополнительной возможностью экспрессии одной или больше дополнительных биологических молекул.

30 В одном варианте реализации указанная дополнительная одна или больше молекул содержит ИЛ-12, и/или SANT7, и/или GAL3C. В одном варианте реализации указанные CAR-T-клетки экспрессируют одноцепочечный полипептид, содержащий одну субъединицу p35 ИЛ-12 и одну субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером. В одном варианте реализации указанные p35 ИЛ-12 и p40 ИЛ-12 соединены

35 (G₄S)₃-линкером. В одном варианте реализации указанный одноцепочечный полипептид ИЛ-12 образует биоактивный гетеродимер p70 ИЛ-12. В одном варианте реализации указанныя CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанныя одна или больше биологических молекул представляет собой SANT7. В одном варианте реализации указанныя CAR-T-клетка экспрессирует SANT7

40 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанный селективный маркер представляет собой GAL3C. В одном варианте реализации указанныя CAR-T-клетка экспрессирует GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанныя CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12, SANT7 и селективный маркер. В одном варианте реализации указанныя CAR-T-клетка экспрессирует ИЛ-12, GAL3C и селективный

45 маркер. В одном варианте реализации указанныя CAR-T-клетка экспрессирует SANT7, GAL3C и селективный маркер. В одном варианте реализации указанныя CAR-T-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 (ДВКЛ), амилоидозом или другим В-клеточным злокачественным новообразованием, экспрессирующим КМА, ФРГ-связывающий белка. В одном варианте реализации указанный ФРГ-связывающий

5 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-T-клетка также экспрессирует указанный ФРГ-связывающий белок.

10 [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

15 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

20 дополнительный фармацевтически активный агент представляет собой ингибитор гистондеацетилазы. Согласно еще одному варианту реализации указанный ингибитор гистондеацетилазы представляет собой панобиностат, вориностат, трихостатин А, депептиды, фенилбутират, вальпроевую кислоту, белиностат, LAQ824, энтиностат, CI944 или моцетиностат. Согласно еще одному варианту реализации указанный один

25 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

30 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-T-клетки согласно настоящему изобретению вводят до, одновременно с или после аллогенного трансплантата стволовых клеток. Согласно еще одному варианту реализации CAR-T-клетки согласно

35 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 40 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 45 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 одноцепочный 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 ВВ или ОХ-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 5×10⁵ - 5×10⁶ 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 KM.CAR-T-клеток и экспрессия CAR для конструкций, описанных в примере 3. На фиг. 8А представлен общий показатель размножения клеток в культурах CAR-T-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 = T-клетки KM.CAR_hCH2CH3_28z; hCH2CH3mut = T-клетки KM.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz; h = T-клетки KM.CAR_h_28TM_41BBz; CD8a = T-клетки KM.CAR_8a_28TM_41BBz.

[0027] На фиг. 9 показана структура индуцируемой активацией транспозонной кассеты. IR = инвертированные повторы; Ins = инсуллятор, фланкирующий два конца генной вставки; NFATpro = индуцируемый активацией промотор; BGHPA = 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

5 экспрессировали eGFP при стимуляции.

[0029] На фиг. 11 показана структура индуцируемой активацией транспозонной кассеты с CAR и биологическим средством. IR = инвертированные повторы; Ins = инсулитор, фланкирующий два конца генной вставки; NFATpro = индуцируемый активацией промотор; BGHрA = сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста;

10 EF1 α = промотор фактора удлинения 1 альфа человека; SV40 = поздний сигнал полиаденилирования вируса обезьян.

[0030] На фиг. 12А-12В показаны получение КМА-специфического интерферона-гамма и стандартный анализ на цитотоксичность Т-клеток KM.CAR_hCH2CH3_28z (фиг. 12А) или Т-клеток KM.CAR_h_28TM_41BBz с высвобождением хрома (фиг. 12 В) 15 в линиях КМА+ и КМА- клеток. Использованные 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

20 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 25 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. артикулям «а» и «ап» в исходном тексте на английском языке) используют в настоящем документе для обозначения одного или 30 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 нукleinовой кислоты, содержащую по меньшей мере одну последовательность контроля экспрессии, функционально 35 связанную с последовательностью нукleinовой 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 40 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 45 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 корецептора, например, цепью CD3 ζ , описанное в настоящем документе изобретение не ограничено указанными доменами. Так, в настоящем документе

5 «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 10 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 15 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 20 «трансмембранный домен», который заекоривает 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, 25 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 30 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 35 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 40 связывающий домен» представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

[0039] Под «одноцепочечным вариабельным фрагментом», или «scFv» подразумевается гибридный белок из вариабельной области тяжелой (VH) и 45 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 вариабельные 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. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В настоящем документе 20 термин «антитело» также охватывает фрагменты антитела.

[0041] Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела и относится к определяющим антигены вариабельным 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 вариабельных цепей антител (тяжелые и легкие цепи), которые распознают и связывают конкретный антиген. Участки CDR представляют собой наиболее вариабельную часть вариабельных цепей и обеспечивают специфичность антитела. На каждой из вариабельных областей тяжелых (VH) и вариабельных 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 КаппаMab может включать полное моноклональное антитело или любой его антигенсвязывающий фрагмент, в том числе Fab и scFv.

- 5 [0046] Термин «антigen», или «Ag» в настоящем документе определен как молекула, которую распознает рецептор иммунной клетки (например, Т-клеточный рецептор, В-клеточный рецептор/имmunоглобулин). В некоторых вариантах реализации антigen 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 антigenом может служить любая макромолекула, в том числе практически все белки или пептиды.

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

- 20 [0048] Под «рибосомальным перепрыгиванием» подразумевается альтернативный механизм трансляции, при котором специфический пептид препятствует ковалентному 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 2A» 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» 2A. Указанный элемент «рибосомального перепрыгивания» 2A может представлять собой 5'-элемент «рибосомального перепрыгивания» T2A.

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

- 40 [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 перечисленными: гидроксамовые кислоты, включая, например, трихостатин A, вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), LAQ824, панбиностат (LBH589); циклические трипептиды, в том числе, например, депептиды и тайпоксин B; 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 мембранны, присутствующий на поверхности клеток миеломы. Конкретно, КМА состоит из свободных легких цепей каппа, экспрессируемых на клеточной мемbrane 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 КappaMab. Моноклональное антитело, обозначаемое как КappaMab (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 КappaMab, показанное на фиг. 3. Антитело КappaMab может содержать VH-цепь последовательности SEQ ID NO: 1 и VL-цепь последовательности SEQ ID NO: 2. Более конкретно, VH-цепь КappaMab может содержать участки CDR последовательности SEQ ID NO: 3-5 и участки CDR VL последовательности SEQ ID NO: 6-8. Дополнительно КappaMab 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 спайсера(ов) (фиг. 1А-1В). Чаще всего CAR представляют собой гибридные белки из одноцепочных вариабельных фрагментов (ScFv), слитых с трансмембранным доменом CD3 ζ . Однако могут применяться и другие внутриклеточные сигнальные домены, такие как CD28, 41-BB и Ox40, 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 КappaMab. 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) КappaMab. В другом варианте реализации указанный внеклеточный связывающий домен представляет собой scFv, содержащий домены VL (SEQ ID NO: 21) и VH (SEQ ID NO: 22) КappaMab.

II. Линкер между доменами VL и VH scFv KappaMab

[0054] В еще одном варианте реализации домен VL KappaMab соединен с доменом VH KappaMab 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 (Gly_4Ser)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. Спайсеры между внеклеточным антигенсвязывающим доменом и внутриклеточным сигнальным доменом

[0055] Внеклеточный антигенсвязывающий домен (например, scFv КаппаMab) соединяют с внутриклеточным сигнальным доменом при помощи «спайсера». Указанный спайсер разработан таким образом, чтобы обладать достаточной гибкостью, обеспечивающей ориентацию антигенсвязывающего домена, облегчающую распознавание и связывание антигена. Указанный спайсер 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 спайсера(ов) зависят как от распознавающего 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 спайсер может быть обозначен в настоящем документе как «opti» (см. фиг. 6A-6C), что означает, что оптимальные характеристики и длина спайсера 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 C→P 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-T-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 спайсер (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, 10 представлен последовательностью SEQ ID NO: 26.

[0057] В дополнение к включению сигнального домена CD3 ζ , включение костимулирующих молекул, как было показано, усиливает активность CAR-T-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 КараMAb, 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-T-клетки. Примеры комбинаций показаны, например, на фиг. 6А-6С.

20 Помимо изменения длины внеклеточного шарнира, включение конкретных комбинаций костимулирующих доменов (например, CD28, OX-40, 4-1BB) также повышает пролиферацию и выживаемость CAR-T-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-T-клетки согласно настоящему изобретению имеют дополнительное преимущество по сравнению с применением только КараMAb, так как они могут быть дополнительно модифицированы для включения дополнительных биологически активных молекул, усиливающих противоопухолевую функцию и/или повышающих 30 безопасность композиций. В одном варианте реализации указанные CAR-T-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 35 могут усиливать противоопухолевый ответ CAR-T-клеток согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения, ИЛ-12, углевод-связывающий белок галектин-3 (GAL3) или его усеченную форму, GAL3C, и супер-антагонист цитокиновых рецепторов SANT7. В другом варианте реализации CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению могут также быть котрансдуцированы плазмидой, которая экспрессирует 40 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 45 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 (Airaldi, 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).

[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 практическом отсутствии взаимодействия с сигнальной субъединицей gp130. SANT7 индуцирует апоптоз в клетках ИЛ-6-зависимых линий миеломы *in-vitro*, устраняет 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 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. (Aioldi, et al. (2008) *Blood*, 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 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 множественной миеломе. Ответ на собственно силтуксимаб отсутствовал, однако была распространена гематологическая токсичность, при этом более чем в половине случаев наблюдалась 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 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 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 модифицировали одним или больше экспрессионными векторами, содержащими ИЛ-12, SANT7 и/или GAL3C. Например, экспрессионные конструкции, экспрессирующие одноцепочный 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 p70 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

- 5 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
- 10 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
- 15 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
- 20 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); Alexandakis, 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-T-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
- 30 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
- 35 варианте реализации CAR-T-клетка экспрессирует CAR, ФРГ-связывающий белок и ИЛ-12. В еще одном дополнительном варианте реализации CAR-T-клетка экспрессирует CAR, ФРГ-связывающий белок и SANT7. В еще одном дополнительном варианте реализации CAR-T-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,

- 10 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
- 15 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

- 20 с примирением цитокинами и последующего выделения мононуклеарных 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
- 25 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
- 30 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

- 35 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 плазмида с транспозоном PiggyBac является индуцируемой, такой как, например, плазмида с транспозоном PiggyBac, описанная в примерах в настоящем документе. В одном варианте реализации указанная экспрессионная плазмида с транспозоном PiggyBac содержит конститутивно активный промотор и/или
- 40 индуцируемый активацией промотор. Указанный конститутивно активный промотор может представлять собой промотор фактора удлинения 1 альфа (EF1альфа). 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,

- 5 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 10 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 существующему антибиотику, содержащемуся в среде, в которой предполагается культивировать 15 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 20 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 25 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 мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) и подходящими факторами роста; затем проводят их скрининг на присутствие одного 30 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

- 35 [0068] Согласно одному аспекту предложены способы лечения нуждающихся в этом субъектов CAR-T-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 40 новообразование, экспрессирующее КМА. В некоторых вариантах реализации пациент страдает или предположительно страдает множественной миеломой (ММ), макроглобулинемией Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ) или амилоидозом. Способы диагностики В-клеточных злокачественных новообразований, экспрессирующих КМА, например, множественной миеломы (ММ), 45 макроглобулинемии Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВКЛ) и амилоидоза известны в данной области техники, и поэтому подробно не описаны в настоящем документе. Указанные CAR-T-клетки могут применяться по отдельности или в комбинации с другими терапевтически эффективными агентами для лечения

множественной миеломы (ММ), макрогообулинемии Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВКЛ), амилоидоза или другого В-клеточного злокачественного новообразования, экспрессирующего КМА. В некоторых аспектах CAR-T-клетки согласно настоящему изобретению вводят в фармацевтический состав, 5 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 10 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 15 изобретению вводят до, во время или после лечения одним или больше ингибиторов гистондеацетилазы, таким(и) как панобиностат, вориностат, трихостатин А, депептиды, фенилбутират, вальпроевая кислота, белиностат, LAQ824, энтиностат, CI944 или моцетиностат.

[0072] В некоторых аспектах настоящего изобретения CAR-T-клетки согласно 20 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 25 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 30 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 35 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 45 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 каким-либо образом остальную часть настоящего описания.

ПРИМЕР 1: получение КМА.CAR-28z

[0078] На основе последовательности нуклеотидов, кодирующей вариабельные 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. 6А). Указанная конструкция была разработана в Clone Manage 9 (Sci-Ed Software) с применением генетической последовательности вариабельных областей антитела, поставляемого Haemalogix Pty Ltd. Последовательности аминокислот в направлении от 5' к 3' частей указанной конструкции (т.е. KM.CAR-hCH2CH3-28z; фиг. 6А) приведены ниже:

[0079] Лидерный пептид тяжелой цепи Ig (Uniprot P01764):

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR (SEQ ID NO: 20).

[0080] Вариабельная область легкой цепи антитела KappaMab: DIVMTQSQKFMSTS VGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSTSYRSGVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 21).

[0081] Вариабельная область тяжелой цепи: EVQLQQSGAELVKPGASVQLSCTASGF NIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATIIADTSSNTAYLQLSSL TSEDTAVYYCARGVYHDYDGDYWQGTTLVSSYVTVSS (SEQ ID NO: 22).

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

[0083] Шарнир, CH2- и CH3-домены константной области IgG1 с мутацией C>P в шарнирной области в положении аминокислоты 103 (Uniprot P01857): YVTVSSQDPAE PKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK (SEQ ID NO: 24).

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

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

[0086] Полноразмерная последовательность аминокислот имеет следующую последовательность: MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR DIVMTQSQKFMSTS VGDRVSVC KASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSTSYRSGVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSED LAEYFCQQYNSYPYTFGGGTKEIK GGGGGGGGGGGSEVQLQQSGAELVKPGASV KLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATIIADTSSN TAYLQLSSLTSEDTAVYYCARGVYHDYDGDYWQGTTLVSSYVTVSSQDPAEPKSPD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVL VVVGGLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPRD FAAYRSRVKFSRSADA PAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR

KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR (SEQ ID NO: 27).

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

5 [0088] ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTAAAAGGTGTC
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTAAAAATTATGTCACATCAGTA
GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGC
CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTACTCGACATCCTA
CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCA
10 CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTCTGTCA
ATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAAGGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGTCGGTGGCGGAGCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
GTCAGGGCGGAGCTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGTTGCCTGTACAGCTT
CTGGCTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
15 GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
GTCTACCATGATTACGACGGGACTACTGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
CTCCTACGTACCGTCTTCACAGGATCCCAGGAGCCAAATCTCCTGACAAAAC
20 TCACACATGCCAACCGTGCCCAGCACCTGAACCTGGGGGACCGTCAGTCTCCT
CTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCA
25 AGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCTCATC
CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAACCGGAGAACAACTA
CAAGACCAAGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGCT
30 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTATGC
ATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCGAGAACAGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA
AAAGATCCAAATTGGGTGCTGGTGGTGGAGTCCTGGCTATAGC
TTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC
CTGCACAGTGAACATGAACATGACTCCCCGCCCGGGCCCCACCCGCAAGCA
35 TTACCAGCCCTATGCCAACCGCGACTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT
CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCCAGCTCTATAACG
AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGCCGG
GACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACA
ATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG
40 CGAGGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAAGGGCTCAGTACAGCCA
CCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (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 вариабельного 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 выраженнем 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 КМ.CAR-hCH2CH3-28z Т-клетки размножали в соответствии с оптимизированными протоколами авторов изобретения путем совместного культивирования с аутологичными питающими клетками - мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) с добавлением 10 нг/мл интерлейкина-15 (ИЛ-15).

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-
20 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^{-/-}-γc^{-/-} (BALB/c) для получения модели Rag
30 MM (фиг. 5А-5Д). У мышей Rag2^{-/-}-γc^{-/-} (BALB/c) отсутствуют лимфоциты мышей (Т, В и NK-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
35 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 спайсеров вариабельной длины и костимулирующими эндодоменами (например, CD28 или 4-1BB (CD137-Uniport Q07011)), с эндодоменом CD3-зета (фиг. 2 и фиг. 6В-6Д). С помощью спайсера варьирующей длины изменяли расстояние между Т-клеткой и целевой клеткой, при этом более короткий спайсер 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 спайсера применяли компоненты константной области тяжелой цепи IgG1, между scFv и спайсерной 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 5 области тяжелой цепи IgG1 в качестве спейсера и имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

[0096] ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTTAAAAGGTGTC
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTGATGCCACATCAGTA
GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGC

10 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTACTCGACATCCTA
CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCA
CTCTCACCACATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTCTGTCA
ATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA

15 GTCAGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
CTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
GAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG

20 GTCTACCACATGATTACGACGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCCTC
CTCCGGTGGAGGCAGGGTCTGGGGCGGAGGTTCAAGGCAGGGGGTGGTCCGAGGCCA
AAATCTCCTGACAAAACACTCACACATGCCAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGC

25 CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTC
TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACAGAACAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGTAAATTGGGTGCTGGTGGTTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGC
TTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC

30 CTGCACAGTGAACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCCGCAAGCA
TTACCAGCCCTATGCCACCACCGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTT
CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACG
AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATTTGGACAAGAGACGTGGCCGG
GACCGCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACA

35 ATGAACACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG
CGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACAGGGTCTCAGTACAGCCA
CCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:
29).

[0097] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 29) содержит 40 лидерный пептид, вариабельную область легкой цепи КappaMab, (G4S)₃-линкер, вариабельную область тяжелой цепи КappaMab, 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] ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTAAAAATTCAATGTCCACATCAGTA
 GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGC
 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCTAAAGCACTGATTACTCGACATCCTA
 5 CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTCA
 CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTCTGTCACTGCAAT
 ATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAAGGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
 GTCAGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGTTGCCTGTACAGCTT
 10 CTGGCTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
 GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
 GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
 TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTTAACTGTGCTAGGGGG
 GTCTACCATGATTACGACGGGACTACTGGGGCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
 15 CTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGCGGAGGTTCAAGGCGGGGTGGTCCGAGCCCCA
AATCTCCTGACAAAACTCACACATGCCATTGGGTGCTGGTGGTGGAG
 TCCTGGCTTGCTATAGCTTGTAGAACAGTGGCCTTATTATTCTGGGTGAGGA
 GTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAACATGACTCCCCGCCGCCCC
 GGGCCCACCCGCAAGCATTACAGCCCTATGCCCAACACGCGACTTCGCAGCCTA
 20 TCGCTCCAGAGTGAAGTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGCAGGGCC
AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTG
GACAAGAGACGTGGCCGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG
TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTAC
 25 CAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCTTCACATGCAGGCCCT
GCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 30).

[00100] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 30) содержит лидерный пептид, вариабельную область легкой цепи КappaMab, (G4S)₃-линкер, вариабельную область тяжелой цепи КappaMab, второй (G4S)₃-линкер, шарнирный 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 KM.CAR_CD8a_28z, которая содержит «стебель» CD8-альфа (Uniprot P01732, аминокислоты 138-182) в качестве спейсера, и имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

[00102] ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTAAAAATTCAATGTCCACATCAGTA
 GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGC
 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCTAAAGCACTGATTACTCGACATCCTA
 40 CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTCA
 CTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTCTGTCACTGCAAT
 ATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAAGGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
 GTCAGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGTTGCCTGTACAGCTT
 CTGGCTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
 GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
 GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC

TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
 GTCTACCAGTATTACGACGGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
 CTCCACCACGACGCCAGCGCCGCCAGACCAACACCAGGCCACCATCGCGTCGC
 AGCCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCAGCGGCCAGCGGGGGCGCAGTGCAC
 5 ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTGGTGGCTGGTGGTTGGAGTC
 CTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGGTGAGGAGT
 AAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACTACATGAAACATGACTCCCCGCCCG
 GCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCATGCCCAACCACCGCAGTCGAGCCTATCG
 CTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGCAGGGCCAGA
 10 ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGAC
 AAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC
 AGGAAGGCCTGTACAATGAATGCAAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
 GATTGGGATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAAG
 GGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCC
 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 КаппаMab, $(G4S)_3$ -линкер, вариабельную область тяжелой цепи КаппаMab, «стебель» CD8-альфа, трансмембранный и внутриклеточный домены CD28, и внутриклеточный домен CD3-зета.

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

[00105] Первая конструкция указанной группы представлена KM.CAR_h_28TM_41BBz, которая содержит только шарнирный домен константной области тяжелой цепи IgG1 в качестве спейсера, и где внутриклеточный домен CD28 заменен на внутриклеточный домен костимулирующей молекулы 4-1BB, и имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

[00106] ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTAAAAATTGTCACATCAGTA
 25 GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACTAATGTAGC
 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCTAAAGCACTGATTTACTCGACATCCTA
 CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCA
 CTCTCACCACATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTCTGTCAGCAAT
 ATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAAGGGTGGC
 35 GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGCTGGCGGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
 GTCAGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
 CTGGCTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
 GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
 GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
 40 TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
 GTCTACCAGTATTACGACGGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTC
 CTCCGGTGGAGGCCGGTCTGGGGCGGAGGTTCAAGGCGGGGGTGGTCCGAGGCCA
 AATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAG
 TCCTGGCTTGCTAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGGTGAAACG
 45 GGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAAACCATTATGAGACCAGTACAAA
 CTACTCAAGAGGAAGATGGCTTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGG
 ATGTGAACGTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGCAGG
 GCCAGAACCAAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT

TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA
ACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTT
ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCC
CTGCCCTCGC (SEQ ID NO: 32).

[00107] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 32) содержит лидерный пептид, вариабельную область легкой цепи КappaMab, (G4S)₃-линкер, вариабельную область тяжелой цепи КappaMab, 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 KM.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] ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTAAAAATTATGTCCACATCAGTA
 GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGC
 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTACTCGACATCCTA
 20 CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCA
 CTCTCACCACATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTCTGTCA
 ATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
 25 GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGTGGCGGCGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
 GTCAGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGTTGCCTGTACAGCTT
 CTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
 GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
 GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
 TGCACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
 GTCTACCATGATTACGACGGGACTACTGGGCCAAGGGACCACGCTCACCCTC
 30 CTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCCACCACATCGCGTC
 AGCCCCCTGTCCCTGCGCCCGAGAGCGTGCCGCCAGCGGCCGGGGCGCAGTGCAC
 ACGAGGGGGCTGGACTTCGCGCTGTGATTGGTGGTGGTGGTGGAGTC
 CTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGAACAGTGGCCTTATTATTCTGGTGAAACGG
 GGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAAC
 35 TACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGA
 TGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGAGGG
 CCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACCGATGTT
 TGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA
 40 CCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA
 GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTA
 CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCC
 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 КappaMab, (G4S)₃-линкер, вариабельную область тяжелой цепи КappaMab, «стебель» CD8-альфа, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3-зета.

[00111] Третья конструкция указанной группы представлена

КМ.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-T-клеток *in-vivo* (3, 6, 7) путем выведения 5 CAR-T-клеток в ретикулоэндотелиальную систему. Последовательность нуклеиновой кислоты:

[00112] ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTGATGCCACATCAGTA
 GGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGC
 10 CTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTACTCGACATCCTA
 CCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCA
 CTCTCACCACATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTCTGTCA
 ATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGC
GGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGGAGTCTGAGGTGCAGCTGCAGCA
 15 GTCAGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTT
CTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAG
 GGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCC
 GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC
 TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGG
 20 GTCTACCACATGATTACGACGGGACTACTGGGCCAAGGGACCACGCTACCGTCTC
CTCCGGTGGAGGCAGGCTGGGGCTGGGGCGGAGGTTCAAGGCCGGGGTGGTCCGAGGCCA
AATCTCCTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTCCAGTCGCGGG
CCGTCAGTCTCCTCTCCCCCCTTACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTCCAGTCGCGGG
CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGAACGTGAGGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT
 25 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGG
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGACAGGTGTAC
ACCCCTGCCCTCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGCTCACCTGCCT
 30 GGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGC
CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCC
TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACACACAGAACAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGTAAATTGGGTGCTGGTGGTGGAGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGC
 35 TTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTCTGGGTGAACAGGGCAGAAAGAACACTC
CTGTATATATTCAAACAAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGA
TGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACGTGAGAGTGA
AGTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAAGCAGGGCCAGAACCAAGCTCTAT
AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTG
 40 GCCGGGACCCCTGAGATGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCT
GTACAATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG
AAAGGCGAGGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAAGGGTCTCAGTA
CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (SEQ
ID NO: 34).

45 [00113] В направлении от 5' к 3' указанная конструкция (SEQ ID NO: 34) содержит лидерный пептид, вариабельную область легкой цепи КаппаMab, (G4S)₃-линкер, вариабельную область тяжелой цепи КаппаMab, 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 плазмида. 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.

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-антитела миеломы для персистенции *in vitro*

[00131] Культуры, содержащие КМА-экспрессирующие клетки линии JJN3, демонстрировали более высокий общий уровень размножения, повышенную экспрессию 5 КМ.CAR или и то, и другое, по сравнению с культурами, содержащими только МКПК (фиг. 8A-8B). В соответствии с известным взаимодействием CH2-домена константной области IgG с Fc-рецепторами, проводили обогащение экспрессирующими 10 КМ.CAR_hCH2CH3_28z T-клетками в присутствии только МКПК (28% CD3⁺ T-клеток), однако более высокие уровни размножения и обогащения наблюдались при добавлении 15 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 T-клетки демонстрировали крайне незначительный уровень экспрессии CAR (6%) и размножения 15 (6-кратное) в присутствии только МКПК, по сравнению с совместным культивированием с JJN3 (26% уровней экспрессии CAR и 17-кратное размножение). КМ.CAR-T-клетки, содержащие только шарнир IgG1 в качестве спейсера, демонстрировали аналогичный 20 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% 25 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 25 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). Использованные линии КМА-положительных клеток включали JJN3, Pfeiffer, NCI-H929. 30 Линии КМА-отрицательных клеток включали Nalm-6 и Molt (фиг. 12A-12B).

[00135] Для проточно-цитометрического анализа на цитокины, 2×10^5 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 35 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 пермеабилизовали цитофиксом и буфером Perm/Wash (BD Biosciences), и окрашивали антителом против 40 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 45 анализа с высвобождением хрома (⁵¹Cr). Целевые клетки метили хроматом натрия ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) (Perkin-Elmer, Уолтем, Массачусетс, США). КМ.CAR-T-клетки предварительно инкубировали с клетками линии K562 в соотношении 1:1 для компенсации активности NK-клеток. Меченные хромом целевые клетки добавляли к КМ.CAR-T-клеткам в трех повторностях при соотношении эфекторных: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

⁵ 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]

¹⁰ Пример 4: получение плазиды с транспозоном PiggyBac с индуцируемым активацией промотором

[00137] Разрабатывали и клонировали одну транспозонную кассету, содержащую конститтивно активный промотор (EF1альфа) и индуцируемый активацией промотор (NFATpro). Индуцируемую активацией генную экспрессионную кассету получали путем разработки NFATpro с применением Clone Manage 9 (Sci-Ed Software), на основе

¹⁵ 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) - GGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGGCGT (SEQ ID NO: 35), за которыми следует минимальный промотор ИЛ-2 - ACATTTGACACCCCCATAATATTTTCCAG AATTAACAGTATAAATTGCATCTCTGTCAAGAGTTCCSTATCACTCTTTAATCA

²⁰ СТАСТСАСАГТААССТСААСТССТГ (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]

GGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTCATACAG
³⁰ AAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGGCGTCAATTGTCCCATCGAAT
 TAGGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTCATACA
 GAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGGCGTCAATTGTCCGGGAC
 ATTTGACACCCCCATAATATTTTCCAGAATTAAACAGTATAAATTGCATCTCTTGT
 CAA GAGTTCCCTATCACTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGAAC
 TCCATGG ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTCACCGGGTGGTCCCCATCCTGG
³⁵ TCGAGCTGGAC GGCGACGTAAACGCCACAAGTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGA
 GGGCGATGCCACCTA CGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGC
 TGCCCGTGCCTGGCCAC CCTCGTGACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTCA
 GCCGCTACCCCGACCACATGAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAA
 GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTT CTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
⁴⁰ CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCC TGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
 ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG CACAAGCTGGAGTACAAC
 ACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA GAACGGCATCAAGGTGAA
 CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC TCGCCGACCACTACC
 AGCAGAACACCCCCATCGGATCCGGAGCCACGAACCTCTCTGT TAAAGCAAGCA
⁴⁵ GGAGACGTTGAAGAAAACCCCGGTCTATTAAATCCTCGACTGTGCCT TCTAGTTG
 CCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGCCTTGCACCTGGAAGGTG CCAC
 TCCCCACTGTCCTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG
 TCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA

GACA ATAGCAGGCATGCTGGGATGCAGTGGCTATGGC (SEQ ID NO: 37).

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

[00141] Указанную кассету синтезировали с использованием коммерческого сервиса

5 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

10 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 (плазмida pVAX1PB NFATGFP-RQR8). Совместная электропорация индуцируемой активацией генной кассеты,

15 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

20 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 25 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 30 антигонист 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 35 (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
40 DKQIRDILDFISALRKETCNKSNMCESSKEADAFWNLNLPKMAEKDGCFYKGFNEETCL
VKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMRTKDLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTN
ASLLTKLQAQNQWLQDMTTLILRSFKEFLIRSLRALRAMHHHHH (SEQ ID NO: 38).
Замены нуклеотидов соответствуют Y31D, G35F, L57D, E59F, N60W, Q75Y, S76K, S118R,
V121D. Предложенная последовательность также содержала замену Q211A, не
45 указанную в опубликованной последовательности.

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

[00147] ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTCGGTCCAGTTGCCTCTCCCTGGGG

CTGCTCCTGGTGTGCCTGCTGCCCTGCCCTGCCAGTACCCCCAGGAGAAGATTCC
 AAAGATGTAGCCGCCCCACACAGACAGCACTCACGAGCTCAGAACGAATTGACAA
 ACAAAATTGGGACATCCTCGACTTATCTCAGCCTTAAGAAAGGAGACATGTAACA
 AGAGTAACATGTGTGAGAGCTCCAAAGAGGCAGACGCATTCTGGAACCTGAACCTT
 5 CCAAAGATGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCTACAAAGGATTCAATGAGGAGACTTG
 CCTGGTGAAAATCATCACTGGTCTTCGAGTTGAGGTATACCTAGAGTACCTCCA
 GAACAGATTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCCAGAGCTGTGCAGATGCGCACAAAA
 GACCTGATCCAGTCCTGCAGAAAAAGGCAAAGAATCTAGATGCAATAACCACCC
 TGACCCAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCTGCAGGCACAGAACCAAGTGGC
 10 TGCAGGACATGACAACTCATCTCATTCTGAGATCTTAAAGGAGTCCTGATCCGTA
 GCCTGAGGGCTTCGGGCTATGCATCATCACCATCACCACT (SEQ ID NO: 39).

[00148] Одноцепочечная конструкция с интерлейкином-12 (Flexi-IL-12) была разработана путем объединения субъединиц p40 и p35 ИЛ-12 (Uniprot P29459 и P29460) с применением гибкого (G₄S)₃-линкера, аналогично описанию у Zhang et al и Chinnasamy et al (18, 19), что позволяет экспрессировать обе субъединицы в виде одной пептидной цепи, которая легко образует биоактивный гетеродимер p70. 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» 2A, могут быть клонированы в плазмиду PiggyBac, описанную в настоящем документе и показанную на фиг. 7.

[00150] Последовательность аминокислот Flexi-IL-12:

25 [00151] MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSVLGSGKTLIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAEEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK
 30 DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEASVPCSGGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFK™NAKLLMDPDKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 40).

35 [00152] В направлении от 5' к 3' конструкция Flexi-IL-12 содержит лидерный пептид, субъединицу p40 ИЛ-12, (G₄S)₃-линкер и субъединицу p35 ИЛ-12.

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

40 [00154] ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTGGTTTCCCTGGTTTCTGGCA
 TCTCCCTCGTGGCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTATGTCGTAGAATTGGAT
 TGGTATCCGGATGCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGA
 AGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTAGGCTCTGGCAAAA
 CCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAA
 GGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAAT
 45 TTGGTCCACTGATATTTAAAGGACCAAGAACCCAAAAATAAGACCTTCTAA
 GATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACAATC
 AGTACTGATTGACATTCACTGTCAGTGCAAAAGCAGCAGAGGCTCTGACCCCCAAGG
 GGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTGCAAGAGAGTCAGAGGGACAACAAG

GAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCAGCTGCTGAGGA
 GAGTCTGCCATTGAGGTATGGATGCCGTTCACAAAGCTCAAGTATGAAA
 ACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAA
 CAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAAGCTGGGAGTAC
 CACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTCTCCCTGACATTCTGCAGGTCCAGGG
 CAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGGACAAGACCTCAGCCACG
 GTCATCTGCCGAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCAGGGCCCAGGACCGCTACTATAG
 CTCATCTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGTGGTGGCGGTGGAAGCGGC
 GTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGCAGCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCA
 GGAATGTTCCCAGCCTTACCACTCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCA
 GCAACATGCTCCAGAACGCCAGACAAACTCTAGAATTTCACCC
 CTGCAACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAA
 AGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTACCATTGGA
 ATTAACCAAGAACATGAGAGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCT
 CTTTCATAACTAATGGAGAGTTGCCTCCAGAAAGACCT
 CTTTATGATGGCCCTGTGCCTAGTAGTA
 TTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGA
 ATGCAAAGCTTCTGATGGATCCTAACAGAGGCAGATCTTCTAGAT
 CAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGCCACAAAAATCCTCC
 TGAAGAACCGGATTTTATAAAACTAAAATCAAGCT
 CTGCATACTTCTCATGCTT
 CAGAATTGGCAGTGACTATTGATAGAGTGAGCTATCTGA
 ATGCTTCC (SEQ 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:

[00156] MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRHHHHHGAPAGPLIVPYNLPLPGGVVPRML
 ITILGTVKPNANRIALDFQRGNDWAFHFNPRFNENNRRVIVCNTKLDNNWGREERQS
 VF PFESGKPKIQLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHRVKKLNEISKLGISGDIDLT
 SASY™ (SEQ ID NO: 42)

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

[00158] ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTGTGGCTATTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGACATCATCACCACCAACGGCGCCCTGCTGGGCCACTGATTGTG
 CCTTATAACCTGCCTTGCCTGGGGAGTGGTGCCTCGCATGCTGATAACAATTCTG
 GGCACGGTGAAGCCAATGCAAACAGAATTGCTTAGATTCCA
 AAAGAGGGAATGA
 35 TGTTGCCTTCACTTAACCCACGCTCAATGAGAACAA
 CAGGAGAGTCATTGTTG
 CAATACAAAGCTGGATAATACTGGGAAGGGAAAGAAAGACAGTCGGTT
 CCCAT TTGAAAGTGGAAACCATTCAA
 AACTACAAGTACTGGTGAACCTGACCACTCAAG
 GTTGCAGTGAATGATGCTCACTGTTGCAGTACAATCATGGGTT
 AAAAAGACTCAAT
 GAAATCAGCAA
 ACTGGGAATTCTGGT
 GACATAGACCTCACCAGTGCTTCATATAACC
 40 ATGATA (SEQ ID NO: 43)

[00159] Проводят нуклеоферцию содержащими CAR и «биологические средства» транспозонными плазмидами с получением CAR-T-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

⁵ анализов с совместным культивированием с клетками линий миеломы для оценки ингибиции 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

¹⁰ RPMI-Rag у мышей разрабатывают модели RPMI-Rag-Luc (КМА-) и JJN3-Rag-Luc (КМА+) для оценки функции полученных авторами настоящего изобретения CAR-T-клеток *in vivo*. Клетки JJN3 и RPMI8226 трансфицируют Luc-1 и затем инокулируют в/в мышам Rag2-/-γc-/- (BALB/c) для получения моделей MM JJN3- Rag-Luc и RPMI-Rag-Luc.

Проводят мониторинг приживления и уровней заболевания путем оптической

¹⁵ визуализации после в/в инъекции люцифера, и сопоставляли с уровнями легких цепей каппа (JJN3) 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 JJN3-Rag-Luc и RPMI-Rag-Luc мышам инокулируют в/в возрастающие дозы CAR-T-

²⁰ 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.

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

³⁵ 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.

⁴⁰ 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.

⁴⁵ 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 вариабельный 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 KappaMab, при этом участки CDR указанных KappaMAb 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 KappaMab, 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 KappaMab соединены глицин-сериновым линкером.

15 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 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$.

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

20 17. Химерный антигенный рецептор по п. 16, в котором указанный спайсер 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 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 спайсер 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 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$.

25 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 (G_4S)₃.

30. Генетически модифицированная Т-клетка по п. 29, причем указанный однолепочечный полипептид, содержащий одну субъединицу p35 ИЛ-12 и одну субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, образует биоактивный гетеродимер p70 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-антител миеломы (КМА).

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 CD3 ζ , домена 4-1BB или домена OX-40, или их комбинаций.

46. Способ по п. 45, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3 ζ и домен CD28.

47. Способ по п. 45, в котором указанные костимулирующие эндодомены представляют собой домен CD3 ζ 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 CD3 ζ и домен 4-1BB.

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

1ВВ.

51. Способ по п. 50, в котором указанный CAR дополнительно содержит домен ОХ-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 KappaMab, 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 KappaMab, 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 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$.

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 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$.

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 p35 ИЛ-12 и субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, образует биоактивный гетеродимер p70 ИЛ-12.

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

¹⁰ 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.

¹⁵ 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».

²⁰ 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.

²⁵ 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.

³⁰ 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.

³⁵ 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 ⁴⁰ каппа-антител миеломы (КМА).

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

⁴⁵ 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-ВВ домен.

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

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

¹⁵ 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 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.

²⁰ 92. Способ по п. 91, в котором VL из SEQ ID NO: 2 и VL из SEQ ID NO: 1 присоединены 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 p35 ИЛ-12 и

⁵ субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером.

107. Способ по п. 106, в котором указанный гибкий линкер представляет собой (G₄S)₃-линкер.

108. Способ по п. 106, в котором указанный одноцепочный полипептид, содержащий субъединицу p35 ИЛ-12 и субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером,

¹⁰ образует биоактивный гетеродимер p70 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.

¹⁵ 111. 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.

²⁰ 113. 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.

²⁵ 116. 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.

³⁰ 118. 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.

³⁵ 120. 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 актимид, леналидомид или помалидомид.

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

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

⁴⁵ 124. 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 FcgammaRIIa and FcgammaRIIb 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*. 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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.

30 Micklethwaite, Kenneth

Dunn, Rosanne

Gottlieb, David

Logan, Grant

Harrison, Simon

35 <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

40 <151> 2015-05-07

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 449

45 <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 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 aggggcggag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
 tcctgtacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tgcaactgggt gaagcagagg 120
 cctgaacagg gcctggagtg gatttggaaagg attgatcctg cgaatggtaa cactaaatat 180
15 gaccgcagaat tccaggcCAA ggccactata atagcagaca catcctccAA cacagcctac 240
 ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc taggggggtc 300
 taccatgatt acgacgggGA ctactgggGC caagggacca cgctcaccgt ctccctcc 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
 gtcacactgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgttag cctggtatca acagaaacca 120
 gggcaatctc ctaaaggact gatttactcg acatcctacc ggtacagtgg agtccctgtat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg 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-Gamm1-neo expression vector
 <220>

<221> misc_feature

40 <222> (11)..(11)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>

<221> misc_feature

45 <222> (947)..(947)
 <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 tatgcaaatac ctctgaatct acatggtaaa 60
tataggtttg tctataccac aaacagaaaa acatgagatc acagttctct ctacagttac 120
tgagcacaca ggacctcacc atggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag 180
ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggtctgg acatatatat gggtgacaat 240
35 gacatccact ttgcctttct ctccacaggt gtgcactccg aggtgcagct gcagcagtca 300
ggggcggagc ttgtgaagcc aggggcctca gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc 360
aacattaaag acacctatac gcactgggtg aagcagaggc ctgaacaggg cctggagtgg 420
attggaagga ttgatcctgc gaatggtaac actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag 480
gccactataa tagcagacac atcctccaac acagcctacc tgcaagctcag cagcctgaca 540
40 tctgaggaca ctgcccgtcta ttacttgtct aggggggtct accatgatta cgacggggac 600
tactggggcc aagggaccac gctcaccgtc tcctccgggt agtggatccc aagctagctt 660
tctggggcag gccaggcctg accttggctt tggggcaggg agggggctaa ggtgaggcag 720
gtggcgccag ccaggtgcac acccaatgcc catgagccca gacactggac gctgaacctc 780
gcggacagtt aagaacccag gggcctctgc gcccctggcc cagctctgtc ccacaccgcg 840
45 gtcacatggc accacacccctc ttgcagcctc caccaaggac ccacatcggtct tccccctggc 900
accacccctcc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgnctt ggtcaaggac 960
tacttcccccc gaaccgggtga cgggtgtcgta gaactcangc gcccctgacna gcgggggtgca 1020
caccttncgg gntgtnctac agtnctcagg actctactcc ctcancagcg tggtgaccgt 1080

```

gcccncatcagc agctngggnn 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
ncagggcgat cngcctccgc aagcttatga atatgcaa atctgtaaac tacatggtaa 60
20 atatagggtt gtctatacc caaacagaaa aacatgagat cacagtctc tctacagtt 120
ctgagcacac aggacctcac catggatgg agctgtatca tcctcttctt ggttagcaaca 180
gctacaggta aggggctcac agtagcaggc ttgaggtctg gacatatata tgggtgacaa 240
tgacatccac tttgccttc tctccacagg tgtgcactcc gacatcgta tgaccaggc 300
tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc gtcacctgca aggccagtc 360
25 gaatgtgggt actaatgttag cctggtatca acagaaacca gggcaatctc ctaaaggact 420
gatttactcg acatcctacc ggtacagtgg agtccctgat cgcttcacag gcagtggtc 480
tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct gaagacttgg cagagtattt 540
ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg gggaccaagc tggaaataaa 600
gggtgagtgg atcctagaat tctaaactct gagggggctg gatgacgtgg ccattcttg 660
30 cctaaagcat tgagttact gcaaggtcag aaaagcatgc aaagccctca gaatggctgc 720
aaagagctcc aacaaaacaa tttagaactt tattaaggaa tagggggaaag ctaggaagaa 780
actcaaaaaca tcaagattt aaatacgctt ctggctctcc ttgctataat tatctggat 840
aagcatgctg tttctgtct gtccctaaca tgccctgtga ttatccgcaa acaacacacc 900
caagggcaga actttgttac ttaaacacca tcctgtttgc ttcttcctc aggaactgtg 960
35 gctgcaccat ctgtcttcat ctcccccca tctgtatgac anntgaaatc tggnaactgc 1020
ctctgttgtg tgcctgctga aaaacttcta tcccnanagg ccaaagtaca gtggaagggg 1080
aaanccccct cnatcgnaa 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 aggattgtatc ctgcgaatgg taacactaaa tatgaccgaa agttccaggg c 51
<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
10 <220>
<223> human monoclonal antibody VH CDR
<400> 15
gggggtctacc atgattacga cggggactac 30
<210> 16
15 <211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> human monoclonal antibody VL CDR
20 <400> 16
aaggccagtc agaatgtgg 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
cagcaataa acagcttatcc 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

RU 2743 188 C2

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 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 Ser Gly Gly Gly
 325 330 335
 Gly Ser 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

RU 2743 188 C2

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 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 Ser 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 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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 35 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser 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

atggggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa 1920
 gataagatgg cgaggcccta cagttagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag 1980
 gggcacatgt gccttacca gggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt 2040
 cacatgcagg ccctgcccc tcgc 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

tggagttgg gctgagctgg cttttcttg tggctattt aaaagggtgc cagtgcctta 60
 gagacatcgt catgaccagg tctcaaaaat tcatgtccac atcagtagga gacagggtca 120
 gcgtcacctg caaggccagt cagaatgtgg gtactaatgt agcctggtat caacagaaac 180

15 cagggcaatc tcctaaagca ctgatttact cgacatccata ccggtacagt ggagtccttg 240
 atcgcttcac aggcaagtgg tctggacag atttcactct caccatcagc aatgtgcagt 300
 ctgaagactt ggcagagtt ttctgtcagc aatataacag ctatccgtac acgttcggag 360
 gggggaccaa gctggaaata aagggtggcg gtggctcggg cggtggtggg tcgggtggcg 420
 gcggatctga ggtcagctg cagcagtcag gggcggagct tgtgaagcca ggggcctcag 480

20 tcaagttgtc ctgtacagct tctggcttca acattaaaga cacatatg cactgggtga 540
 agcagaggcc tgaacagggc ctggagtgga ttggaggat tgatcctgc aatggtaaca 600
 ctaaatatga cccgaagttc cagggcaagg ccactataat agcagacaca tcctccaaca 660
 cagcctacct gcagctcagc agcctgacat ctgaggacac tgccgtctat tactgtgcta 720
 ggggggtcta ccatgattac gacggggact actggggcca agggaccacg ctcaccgtct 780

25 cctccgggtgg aggccgggtct gggggcggag gttcaggcgg ggggtggttcc gagccaaat 840
 ctcctgacaa aactcacaca tgcccaggc agcccccaga accacaggtg tacaccctgc 900
 ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct 960
 tctatcccg cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca 1020
 agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg 1080

30 tggacaagag caggtggcag cagggaaacg tcttctcatg ctccgtatg catgaggctc 1140
 tgcacaacca ctacacacag aagacccctt ccctgtctcc gggtaattt tgggtgctgg 1200
 tgggtggttgg tggagtcctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc tttattattt 1260
 tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac atgactcccc 1320
 gccgccccgg gcccaccgc agcattacc agccctatgc cccaccacgc gacttcgcag 1380

35 cctatcgctc cagagtgaag ttcaagcagga gcgcagacgc ccccgctac cagcagggcc 1440
 agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtagat gttttggaca 1500
 agagacgtgg cccggaccct gagatgggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag 1560
 gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttagt attggatga 1620
 aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggcctta ccagggtctc agtacagcca 1680

40 ccaaggacac ctacgacgcc ctacatgc 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 gcttttctt gtggctattt taaaagggtgt ccagtgcct 60

agagacatcg tcatgaccca gtctaaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggtc 120
5 agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180
ccagggcaat ctcctaaagc actgatttac tcgacatcct accggtagac tggagtccct 240
gatcgcttca caggcagtgg atctggaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag 300
tctgaagact tggcagagta ttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat aaagggtggc ggtggctcgg gcgggtgg tgcgggtggc 420
ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtca gggcggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
10 aagcagaggc ctgaacaggg cctggagtgg atttggaaagg ttgatcctgc gaatggtaac 600
actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag gccactataa tagcagacac atcctccaac 660
acagcctacc tgcaagtcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct 720
aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gtcaccgtc 780
tcctccggtg gaggcgggtc tggggcggga gtttcaggcg ggggtggttc cgagcccaa 840
tctcctgaca aaactcacac atgcccattt tgggtgctgg tgggtggttgg tggagtccctg 900
15 gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc tttatttattt tctgggtgag gagtaagagg 960
agcaggctcc tgcaagtcga ctacatgaac atgactcccc gccgccccgg gcccacccgc 1020
aagcattacc agccctatgc cccaccacgc gacttcgcag cctatcgctc cagagtgaag 1080
ttcagcagga ggcgcagacgc ccccgctac cagcaggggcc agaaccagct ctataacgag 1140
ctcaatctag gacgaagaga ggagttacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct 1200
20 gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 1260
aaagataaga tggcggaggc ctacagttag attggatga aaggcgagcg ccggaggggc 1320
aaggggcacg atggcctta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 1380
cttcacatgc aggcctgccc 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
atggagtttggctgagctggctttctt gttggctattttaaaagggtgt ccagtgcctct 60
agagacatcg tcatgaccca gtctaaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggtc 120
5 agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180
ccagggcaat ctcctaaagc actgatttac tcgacatcct accggtagac tggagtccct 240
gatcgcttca caggcagtgg atctggaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag 300
tctgaagact tggcagagta ttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
ggggggacca agctggaaat aaagggtggc ggtggctcgg gcgggtgg tgcgggtggc 420
ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtca gggcggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
10 aagcagaggc ctgaacaggg cctggagtgg atttggaaagg ttgatcctgc gaatggtaac 600
actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag gccactataa tagcagacac atcctccaac 660
acagcctacc tgcaagtcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct 720
aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gtcaccgtc 780
tcctccacca cgacgcccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgccaccat cgctgcgcag 840
45 cccctgtccc tgccggcaga ggcgtggcgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg 900
gggctggact tcgcctgtga tttttgggtg ctgggtgg tgggtggagtttgc 960
tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatttatttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 1020
ctcctgcaca gtgactacat qaacatgact cccgcgcgc ccggcccccac ccqcaagcat 1080

taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc 1140
 agagacgcag acgcccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctaat 1200
 ctaggacgaa gagaggagta cgatgtttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1260
 gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1320
 5 aagatggcgg aggccctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1380
 cacgatggcc ttaccaggg 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 atggagttg ggctgagctg gcttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgcct 60
 agagacatcg tcatgaccca gtctaaaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggc 120
 agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180
 ccagggcaat ctcctaaagc actgatttac tcgacatcct accggtagc tggagtcct 240
 gatcgcttca caggcagtgg atctggaca gatttcactc tcaccatcag caatgtcag 300
 20 tctgaagact tggcagagta ttctgtcag caatataaca gctatccgt aacgttcgga 360
 ggggggacca agctggaaat aaagggtggc ggtggctcgg gcgggtgtgg gtcgggtggc 420
 ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtca gggcggagc 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 ctggcgctta ttactgtgct 720
 aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gctcaccgtc 780
 tcctccggtg gaggcgggtc tggggcggta gttcaggcg ggggtgttc cgagcccaa 840
 tctcctgaca aaactcacac atgccattt tgggtgctgg tgggtgttgg tggagtcctg 900
 30 gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc ttattattt tctgggtgaa acggggcaga 960
 aagaaactcc tgtatataatt caaacaacca ttatgagac cagtaaaac tactcaagag 1020
 gaagatggct gtagctgccc atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg 1080
 aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac 1140
 gagctcaatc taggacgaag agaggagtagc gatgtttgg acaagagacg tggccggac 1200
 35 cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg 1260
 cagaaagata agatggcggg ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga ggcgggagg 1320
 ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac 1380
 gcccttcaca tgcaggccc gccccctcgc 1410
 <210> 33
 40 <211> 1464
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Full length KM.CAR_8a_28TM_41BBz nucleic acid construct
 <400> 33
 45 atggagttg ggctgagctg gcttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgcct 60
 agagacatcg tcatgaccca gtctaaaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggc 120
 agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180

ccagggcaat ctcctaaagc actgattac tcgacatcct accggtag tggagtccct 240
 gatcgcttca caggcagtgg atctggaca gatttactc tcaccatcg caatgtcag 300
 tctgaagact tggcagagta ttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
 ggggggacca agctggaaat aaagggtggc ggtggctcg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
 5 ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtca gggcgggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
 gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
 aagcagaggc ctgaacaggg cctggagtgg atttgaagga ttgatcctgc gaatggtaac 600
 actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag gccactataa tagcagacac atcctccaac 660
 acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgcccgtcta ttactgtgct 720
 10 aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gctcaccgtc 780
 tcctccacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacacccgg cgcccaccat cgctcgcag 840
 cccctgtccc tgcccccaga ggcgtgcccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg 900
 gggctggact tgcctgtga tttttgggtg ctgggtggtgg ttggtgaggt cctggcttgc 960
 tatagtttgc tagtaacagt ggcctttatt atttctggg tgaaacgggg cagaaagaaa 1020
 15 ctcctgtata tattcaaaca accatttatg agaccagtac aaactacta agaggaagat 1080
 ggctgttagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc 1140
 agcaggagcg cagacgcccc cgcttaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc 1200
 aatcttaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag 1260
 atggggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa 1320
 20 gataagatgg cggaggccta cagttagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag 1380
 gggcacgatg gcctttacca gggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgcccctt 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 atggagtttggctgagctg gcttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtct 60
 agagacatcg tcatgaccca gtctaaaaaa ttcatgtcca catcagttagg agacagggtc 120
 agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggta tcaacagaaa 180
 ccagggcaat ctcctaaagc actgattac tcgacatcct accggtag tggagtccct 240
 gatcgcttca caggcagtgg atctggaca gatttactc tcaccatcg caatgtcag 300
 35 tctgaagact tggcagagta ttctgtcag caatataaca gctatccgta cacgttcgga 360
 ggggggacca agctggaaat aaagggtggc ggtggctcg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
 ggcggatctg aggtgcagct gcagcagtca gggcgggagc ttgtgaagcc aggggcctca 480
 gtcaagttgt cctgtacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatat gcactgggtg 540
 aagcagaggc ctgaacaggg cctggagtgg atttgaagga ttgatcctgc gaatggtaac 600
 40 actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag gccactataa tagcagacac atcctccaac 660
 acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgcccgtcta ttactgtgct 720
 aggggggtct accatgatta cgacggggac tactggggcc aagggaccac gctcaccgtc 780
 tcctccggtg gaggcgggtc tggggcggga gttcaggcg ggggtggttc cgagccaaa 840
 tctcctgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccagcac ctccagtcgc gggaccgtca 900
 45 gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tcgccccggac ccctgaggc 960
 acatgcgtgg tggtaacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgtg 1020
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta cgccagcacg 1080
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1140

aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1200
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 1260
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg 1320
 gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1380
 5 tccgacggct ccttcctcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1440
 gggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1500
 agcctctccc tgtctccggg taaattttgg gtgctggtgg tgggtggtgg agtcctggct 1560
 tgctatacgct tgcttagtaac agtggcctt attattttct gggtaaacg gggcagaaag 1620
 aaactcctgt atatattcaa acaaccattt atgagaccag tacaaactac tcaagaggaa 1680
 10 gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag 1740
 ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag 1800
 ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gtttgacca agagacgtgg ccgggaccct 1860
 gagatgggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 1920
 aaagataaga tggcggaggc ctacagttagt attggatga aaggcgagcg ccggaggggc 1980
 15 aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 2040
 cttcacatgc aggccctgcc ccctcgc 2067
 <210> 35
 <211> 30
 <212> DNA
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 ggagggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 30
 <210> 36
 <211> 114
 25 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 acatttgac acccccataa tattttcca gaattaacag tataaattgc atctttgtt 60
 caagagttcc ctatcactct cttaatcac 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
 ggagggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt caatttaggag gaaaaactgt ttcatacaga 60
 aggcgtcaat taggaggaaa aactgtttca tacagaaggc gtcaattgtc ccatcgaatt 120
 40 aggagggaaaaa actgtttcat acagaaggcg tcaatttagga gaaaaactg tttcatacag 180
 aaggcgtcaa ttaggaggaa aactgtttc atacagaagg cgtcaattgt cccgggacat 240
 tttgacaccc ccataatatt ttccagaat taacagtata aattgcattt cttgttcaag 300
 agttccatat cactctctt aatcactact cacagtaacc tcaactcctg aactccatgg 360
 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctgggt cgagctggac 420
 45 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgaggcga tgccaccc 480
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggccacc 540
 ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccgaa ccacatgaag 600
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcccc gaaggctacg tccaggagcg caccatctc 660

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 720
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 780
 aagctggagt acaaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 840
 ggcataagg tgaacttcaa gatccgccc aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 900
 5 gaccactacc agcagaacac ccccatcgga tccggagcca cgaacttctc tctgttaaag 960
 caagcaggag acgttgaaga aaaccccggt cctatTTaaa tcctcgactg tgcTTctag 1020
 ttgccagcca tctgttgtt gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac 1080
 tcccactgtc ctTCCTaat aaaatgagga aattgcATcg cattgtctga gtaggtgtca 1140
 ttctattctg gggggTgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaataag 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
 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
 gtgtgcctg ctgccttccc tgccccagta ccccccaggag aagattccaa agatgttagcc 120
 gccccacaca gacagccact cacgagctca gaacgaattg acaaacaat tcgggacatc 180
 ctcgacttta tctcagcctt aagaaaggag acatgtaca aagataacat gtgtgagagc 240
 tccaaagagg cagacgcatt ctggaacctg aacttccaa agatggctga aaaagatgga 300
 10 tgcttctaca aaggattcaa tgaggagact tgcctggtga aaatcatcac tggcttctc 360
 gagtttgagg tatacctaga gtacctccag aacagattt agagtagtga ggaacaagcc 420
 agagctgtgc agatgcgcac aaaagacctg atccagttcc tgcagaaaaa ggcaaagaat 480
 ctagatgcaa taaccacccc tgacccaacc acaaatgcca gcctgctgac gaagctgcag 540
 gcacagaacc agtggctgca ggacatgaca actcatctca ttctgagatc ttttaaggag 600
 15 ttcctgatcc 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 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

RU 2743 188 C2

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 Ser Gly Gly Gly
325 330 335
Gly Ser 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 ttttcctgg ttttctggc atctccctc 60
 gtggccatat gggaaactgaa gaaagatgtt tatgtcgtag aattggattt gatatccggat 120
 gcccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacacccctg aagaagatgg tatcacctgg 180
 5 accttggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgaccat ccaagtcaaa 240
 gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaggag gcgaggttct aagccattcg 300
 ctcctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatattt aaaggaccag 360
 aaagaaccca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgttcc 420
 acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga 480
 10 ggctcttctg acccccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc 540
 agaggggaca acaaggagta ttagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgccc 600
 gctgctgagg agagtctgcc cattgaggc atggtggatg ccgttcacaa gctcaagtat 660
 gaaaactaca ccagcagct cttcatcagg gacatcatca aacctgaccc acccaagaac 720
 ttgcagctga agccattaaa gaattctgg caggtggagg tcagctggga gtaccctgac 780
 15 acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggcaag 840
 agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc 900
 cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcggcc caggaccgct actatacgctc atcttggagc 960
 gaatgggcat ctgtgccctg cagttggatc ggttggaaagcg gcggtggcgg aagcggcggt 1020
 ggcggcagca gaaacctccc cgtggccact ccagaccag gaatgttccc atgccttcac 1080
 20 cactccaaa acctgcttag ggccgtcagc aacatgctcc agaaggccag acaaactcta 1140
 gaattttacc ctgcacttc tgaagagatt gatcatgaag atatcacaaa agataaaaacc 1200
 agcacagtgg aggccctgtt accattggaa ttaaccaaga atgagagttt cctaaattcc 1260
 agagagacct ctttcataac taatgggatc tgcctggct ccagaaagac ctctttatc 1320
 atggccctgt gccttagtag tatttatgaa gacttgaaga tgtaccaggt ggagttcaag 1380
 25 accatgaatg caaagttct gatggatcct aagaggcaga tctttctaga tcaaaacatg 1440
 ctggcagtta ttgatgagct gatgcaggcc ctgaatttca acagtggagac tgtgccacaa 1500
 aaatccccc ttgaagaacc ggattttat aaaactaaaa tcaagctctg catacttctt 1560
 catgcttca gaattcgggc agtactt gatagagtgta 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 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 gcttttctt gtggctattt taaaagggtgt ccagtgcctc 60
 agacatcatc accatcacca cggcgccccc gctggggccac tgattgtgcc ttataacctg 120
 cctttgcctg ggggagtggt gcctcgcatg ctgataacaa ttctggcac ggtgaagccc 180
 20 aatgcaaaca gaattgcttt agatttccaa agagggaatg atgttgccctt ccactttaac 240
 ccacgcctca atgagaacaa caggagagtc attgttgca atacaaagct ggataataac 300
 tggggaaagg aagaaagaca gtcggtttc ccatttggaaa gtgggaaacc attcaaaata 360
 caagtactgg ttgaacctga ccacttcaag gttgcagtga atgatgctca cttgttgacag 420
 tacaatcatc gggttaaaaa actcaatgaa atcagcaaac tggaaatttc tggtgacata 480
 25 gacctcacca gtgcattcata 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.

35 2. Химерный антигенный рецептор по п. 1, в котором указанный один или больше 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 CD3 ζ , домена 4-1BB, домена OX-40 или их комбинаций.

40 3. Химерный антигенный рецептор по п. 1 или 2, в котором указанный внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с КМА и не связывается с легкой цепью каппа иммуноглобулина, связанной с тяжелой цепью иммуноглобулина.

45 4. Химерный антигенный рецептор по п. 3, в котором указанный scFv содержит VL-цепь и VH-цепь KappaMab, 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 KappaMab 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 CD8a.

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-3C (GAL3C), SANT7 или связывающего фактор 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 p35 ИЛ-12 и одну субъединицу p40 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 p35 ИЛ-12 и одну субъединицу p40 ИЛ-12, соединенные гибким линкером, образует биоактивный гетеродимер p70 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-антителом 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 (ДВКЛ) или амилоидоз.

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

15

20

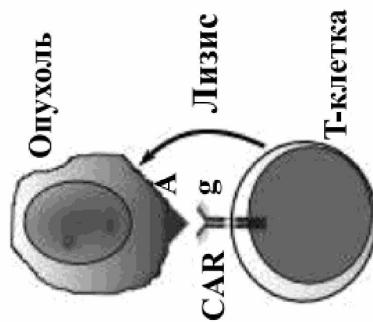
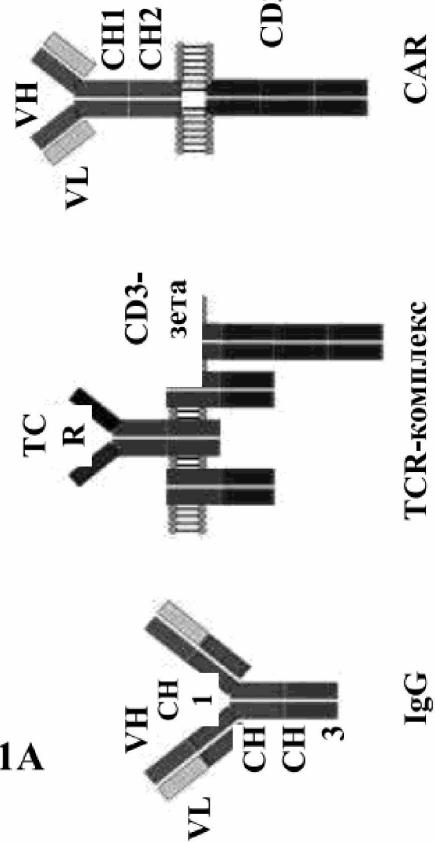
25

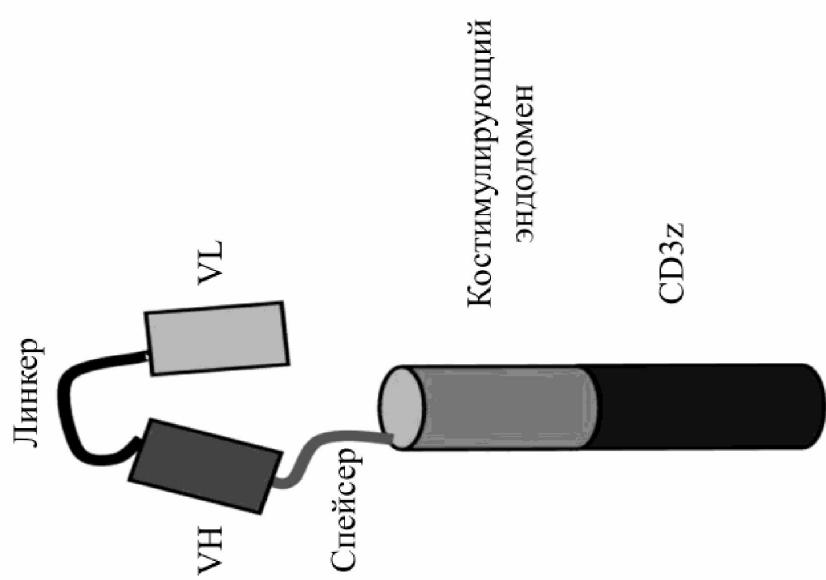
30

35

40

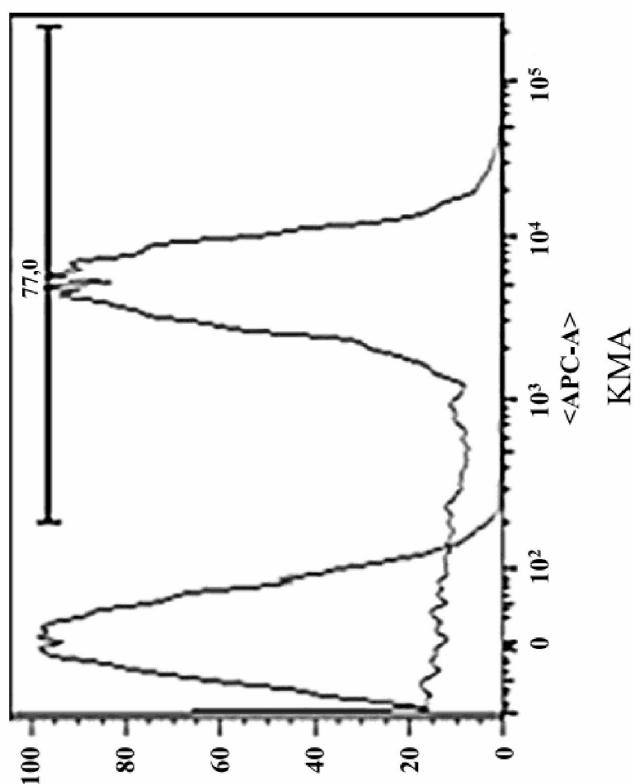
45

**Фиг. 1В****Фиг. 1А**

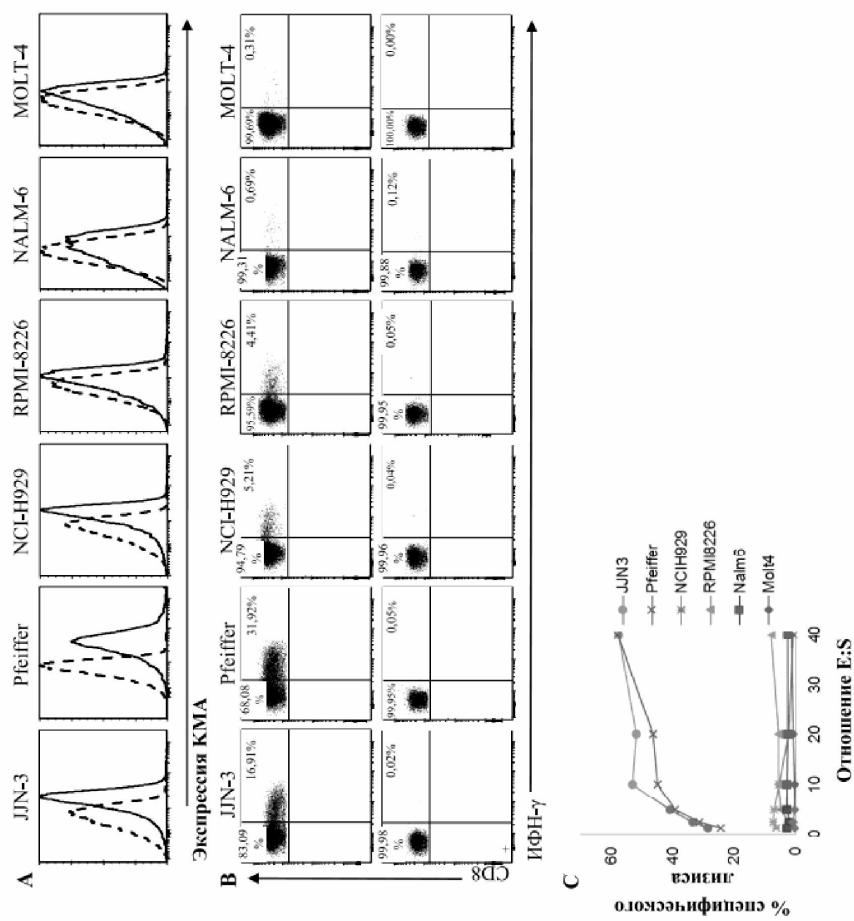


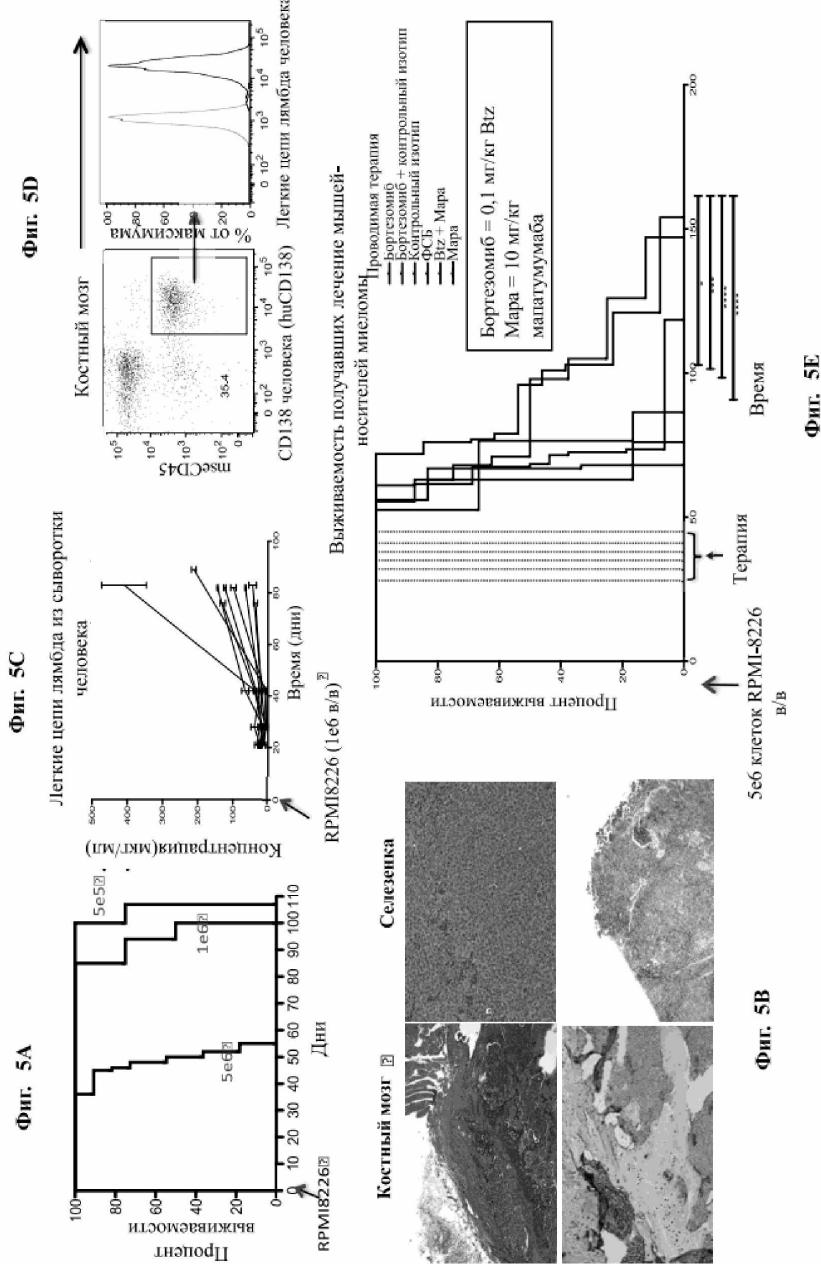
Фиг. 2

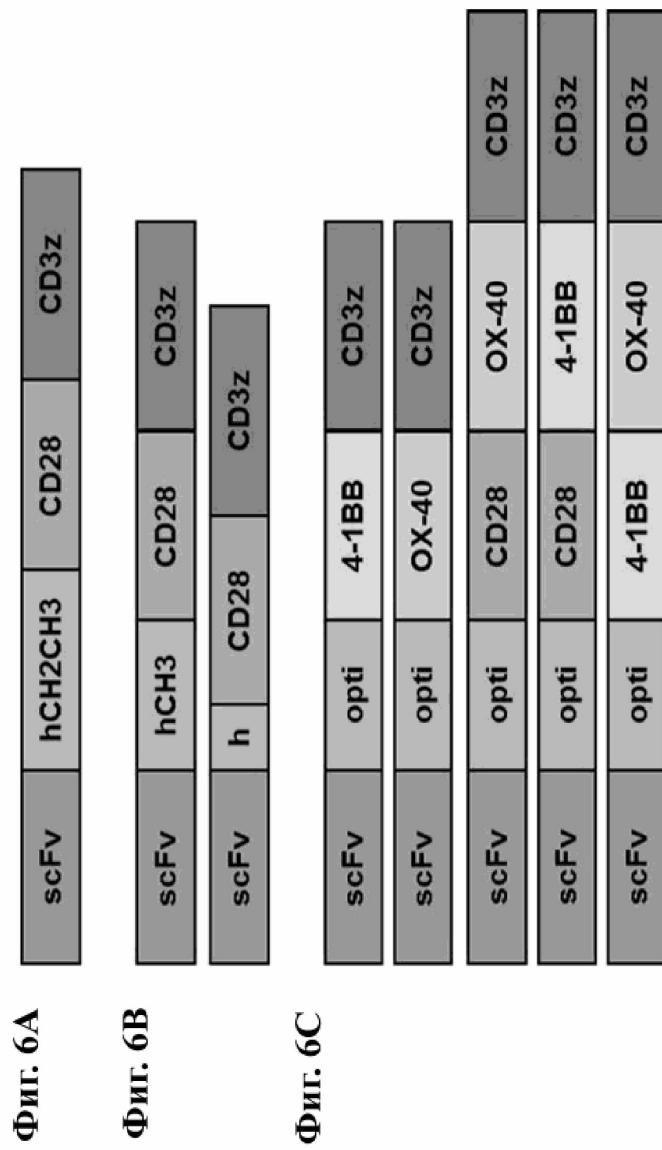
3/12

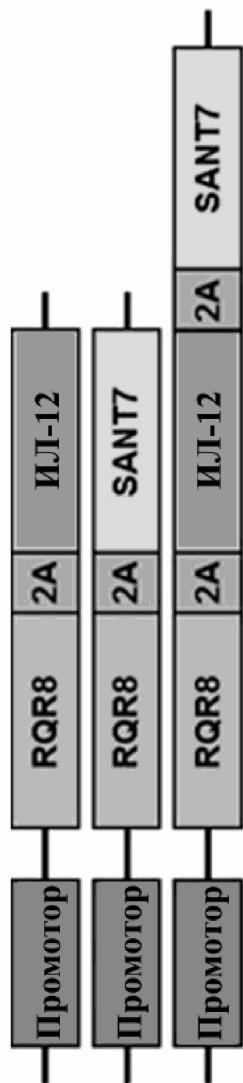


Фиг. 3

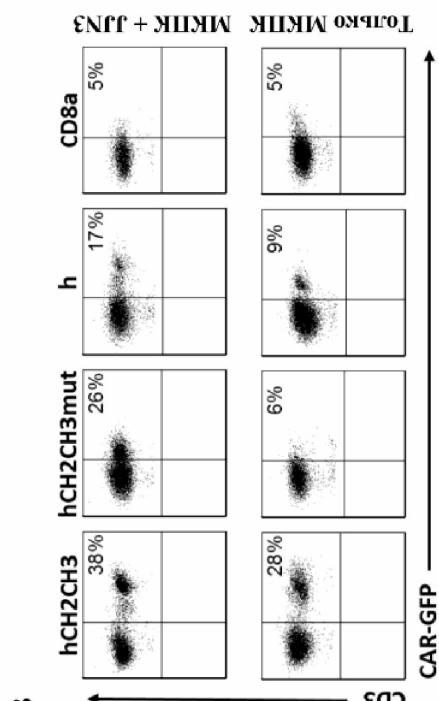
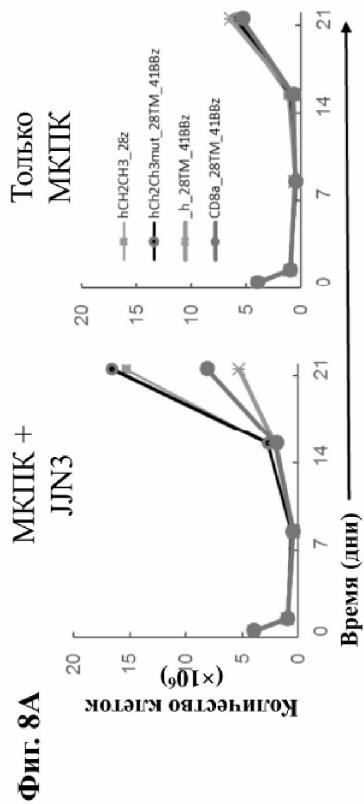








Фиг. 7

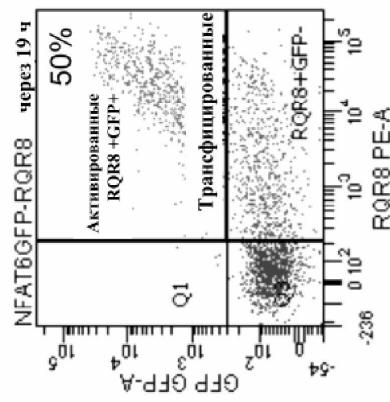


Фиг. 9

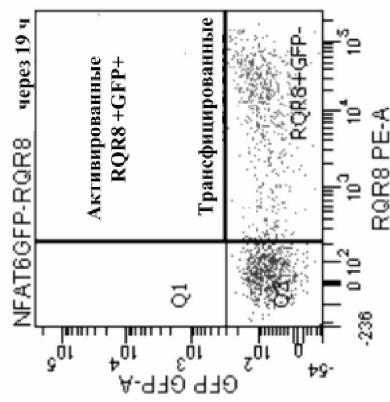


Фиг. 10

ФМА + Иономицин



Нестимулированные

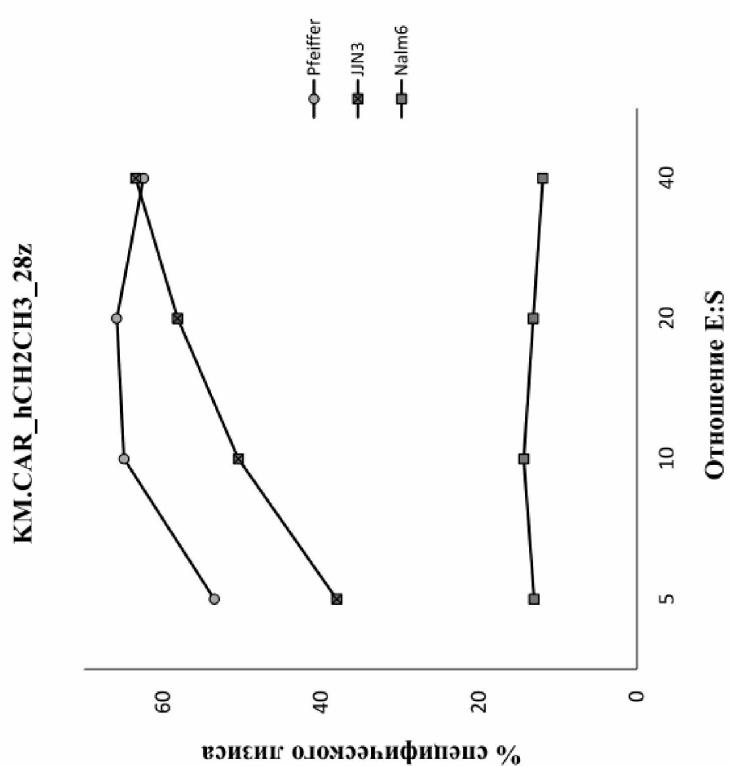


10/12



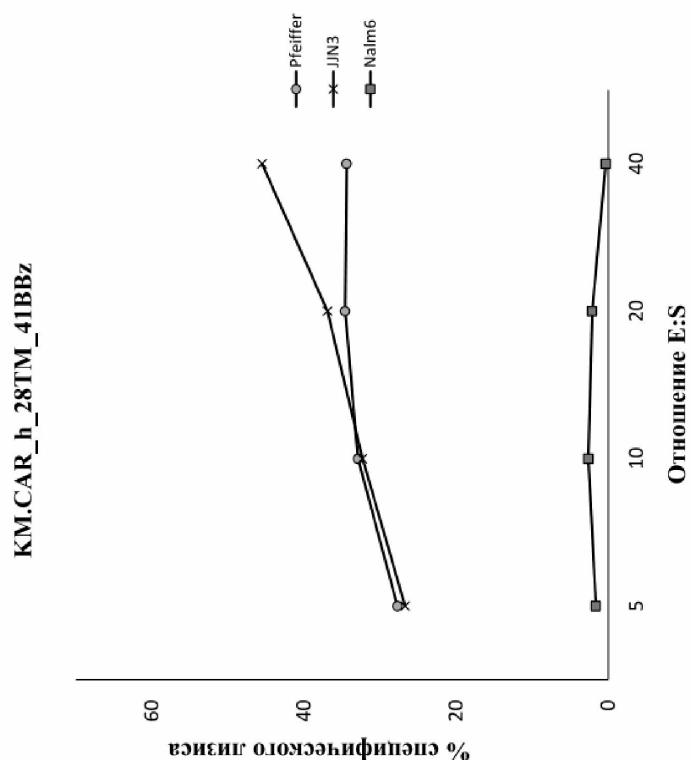
Фиг. 11

11/12



Фиг. 12А

12/12



Фиг. 12В