



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/18 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/177 (2021.02); A61K 38/1774 (2021.02); A61K 39/3955 (2021.02); A61P 13/12 (2021.02); A61P 17/00 (2021.02); A61P 19/02 (2021.02); A61P 21/04 (2021.02); A61P 25/00 (2021.02); A61P 29/00 (2021.02); A61P 35/00 (2021.02); A61P 35/02 (2021.02); A61P 37/00 (2021.02); A61P 37/02 (2021.02); A61P 37/06 (2021.02); A61P 37/08 (2021.02); A61P 7/00 (2021.02); A61P 7/06 (2021.02); A61P 9/00 (2021.02); C07K 14/70503 (2021.02); C07K 14/7051 (2021.02); C07K 14/70517 (2021.02); C07K 14/70521 (2021.02); C07K 14/70578 (2021.02); C07K 16/2878 (2021.02); C12N 15/86 (2021.02); A61K 2039/5156 (2021.02); A61K 2039/572 (2021.02); C07K 2317/24 (2021.02); C07K 2317/524 (2021.02); C07K 2317/526 (2021.02); C07K 2317/53 (2021.02); C07K 2317/56 (2021.02); C07K 2317/565 (2021.02); C07K 2317/622 (2021.02); C07K 2317/73 (2021.02); C07K 2319/02 (2021.02); C07K 2319/03 (2021.02); C07K 2319/10 (2021.02); C07K 2319/33 (2021.02); C12N 2740/15043 (2021.02); C12N 2830/48 (2021.02); C12N 2830/50 (2021.02); C12N 2830/60 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2017106025, 23.07.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.07.2015

Дата регистрации:
05.05.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.07.2014 US 62/028,664;
29.08.2014 US 62/044,103;
24.04.2015 US 62/152,575

(43) Дата публикации заявки: 30.08.2018 Бюл. № 25

(45) Опубликовано: 05.05.2021 Бюл. № 13

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 27.02.2017(86) Заявка РСТ:
US 2015/041722 (23.07.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/014789 (28.01.2016)

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

(72) Автор(ы):

МОРГАН Ричард (US),
ФРИДМАН Кевин (US)

(73) Патентообладатель(и):

БЛУБЁРД БИО, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013/154760 A1, 17.10.2013. WO
2014/100385 A1, 26.06.2014. WO 2010/104949 A2,
16.09.2010. RU 2402569 C2, 27.10.2010.
KOCHENDERFER JN et. al. "Adoptive transfer
of syngeneic T cells transduced with a chimeric
antigen receptor that recognizes murine CD19
can eradicate lymphoma and normal B cells",
Blood, 11.11.2010, Vol. 116(19), pp. 3875-3886.

(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К ВСМА

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий гуманизированное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент. Также рассмотрены полинуклеотиды, кодирующие CAR, вектор для экспрессии, иммунная эффекторная клетка. Кроме того, предложены композиция для лечения

ассоциированного с ВСМА В-клеточного злокачественного новообразования, способ получения иммунной эффекторной клетки и способ лечения ассоциированного с ВСМА злокачественного новообразования. Данное изобретение может найти дальнейшее применение в терапии различных состояний, ассоциированных с ВСМА. 8 н. и 27 з.п. ф-лы, 11 ил., 9 табл., 6 пр.

R U 2 7 4 7 4 5 7 C 2

R U 2 7 4 7 4 5 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 38/177 (2021.02); *A61K 38/1774* (2021.02); *A61K 39/3955* (2021.02); *A61P 13/12* (2021.02); *A61P 17/00* (2021.02); *A61P 19/02* (2021.02); *A61P 21/04* (2021.02); *A61P 25/00* (2021.02); *A61P 29/00* (2021.02); *A61P 35/00* (2021.02); *A61P 35/02* (2021.02); *A61P 37/00* (2021.02); *A61P 37/02* (2021.02); *A61P 37/06* (2021.02); *A61P 37/08* (2021.02); *A61P 7/00* (2021.02); *A61P 7/06* (2021.02); *A61P 9/00* (2021.02); *C07K 14/70503* (2021.02); *C07K 14/7051* (2021.02); *C07K 14/70517* (2021.02); *C07K 14/70521* (2021.02); *C07K 14/70578* (2021.02); *C07K 16/2878* (2021.02); *C12N 15/86* (2021.02); *A61K 2039/5156* (2021.02); *A61K 2039/572* (2021.02); *C07K 2317/24* (2021.02); *C07K 2317/524* (2021.02); *C07K 2317/526* (2021.02); *C07K 2317/53* (2021.02); *C07K 2317/56* (2021.02); *C07K 2317/565* (2021.02); *C07K 2317/622* (2021.02); *C07K 2317/73* (2021.02); *C07K 2319/02* (2021.02); *C07K 2319/03* (2021.02); *C07K 2319/10* (2021.02); *C07K 2319/33* (2021.02); *C12N 2740/15043* (2021.02); *C12N 2830/48* (2021.02); *C12N 2830/50* (2021.02); *C12N 2830/60* (2021.02)

(21)(22) Application: 2017106025, 23.07.2015

(24) Effective date for property rights:
23.07.2015

Registration date:
05.05.2021

Priority:

(30) Convention priority:
24.07.2014 US 62/028,664;
29.08.2014 US 62/044,103;
24.04.2015 US 62/152,575

(43) Application published: 30.08.2018 Bull. № 25

(45) Date of publication: 05.05.2021 Bull. № 13

(85) Commencement of national phase: 27.02.2017

(86) PCT application:
US 2015/041722 (23.07.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/014789 (28.01.2016)

Mail address:
123242, Moskva, Kudrinskaya pl., 1, a/ya 35,
"Mikhajlyuk, Sorokolat i partnery - patentnye
poverennye"

(72) Inventor(s):

**MORGAN Richard (US),
FRIDMAN Kevin (US)**

(73) Proprietor(s):

BLUBERD BIO, INK. (US)(54) **CHIMERIC ANTIGENIC RECEPTORS TO BCMA**

(57) Abstract:

FIELD: immunology.

SUBSTANCE: present invention relates to the field of immunology. A chimeric antigen receptor (CAR) containing a humanized antibody to BCMA or its antigen-binding fragment is proposed. Also considered are polynucleotides encoding CAR, an expression vector, and an immune effector cell. In addition, a

composition for treating BCMA-associated B-cell malignant neoplasm, a method for producing an immune effector cell and a method for treating BCMA-associated malignant neoplasm are proposed.

EFFECT: this invention can find further application in therapy of various conditions associated with BCMA.

35 cl, 11 dwg, 9 tbl, 6 ex

R U 2 7 4 7 4 5 7 C 2

R U 2 7 4 7 4 5 7 C 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с § 119(e) раздела 35 Свода федеральных законов США на основании предварительной заявки на патент США № 62/028664, поданной 24 июля 2014 года, предварительной заявки на патент США № 62/044103, поданной 29 августа 2014 года, и предварительной заявки на патент США № 62/152575, поданной 24 апреля 2015 года, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ЗАЯВЛЕНИЕ В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанный с настоящей заявкой, предоставлен в виде файла в текстовом формате вместо бумажной копии и, тем самым, включен посредством ссылки в настоящее описание. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей, BLBD_037_03WO_ST25.txt. Текстовый файл размером 124 килобайта, был создан 23 июля 2015 года и предоставляется на рассмотрение в электронном виде посредством EFS-Web одновременно с подачей настоящего описания.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область техники

Настоящее изобретение относится к улучшенным композициям и способам лечения состояний, связанных с В-клетками. Более конкретно, настоящее изобретение относится к улучшенным химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим гуманизированные антитела к ВСМА или их антигенсвязывающие фрагменты, к иммунным эффекторным клеткам, генетически модифицированным для экспрессии таких CAR, и к применению их композиций для эффективного лечения состояний, связанных с В-клетками.

Описание предшествующего уровня техники

В-лимфоциты, т. е. В-клетки, вовлечены в ряд значимых заболеваний. Аномальная физиология В-клеток также может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний, в том числе без ограничений к системной красной волчанке (SLE). Злокачественное перерождение В-клеток приводит к формам рака, в том числе без ограничений лимфомам, например, множественной миеломе и неходжкинской лимфоме.

Подавляющее большинство пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями, в том числе неходжкинской лимфомой (NHL) и множественной миеломой (MM), вносят значительный вклад в смертность от рака. Ответ В-клеточных злокачественных новообразований на различные формы лечения неоднозначен. Традиционные методы лечения В-клеточных злокачественных новообразований, в том числе химиотерапия и лучевая терапия, имеют ограниченное применение в силу токсических побочных эффектов. Иммунотерапия с помощью терапевтических антител к CD19, CD20, CD22, CD23, CD52, CD80 и HLA-DR привела к ограниченному успеху, отчасти из-за неудовлетворительных фармакокинетических профилей, быстрой элиминации антител под действием сывороточных протеаз и клубочковой фильтрации, а также из-за ограниченного проникновения в локализацию опухоли и ограниченных уровней экспрессии целевого антигена на раковых клетках. Попытки применения генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR), также имели ограниченный успех из-за слабого *in vivo* размножения Т-клеток с CAR, быстрого исчезновения клеток после инфузии и не оправдывающей ожиданий клинической активности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем изобретении в целом предусмотрены улучшенные векторы для получения средств Т-клеточной терапии и способы их применения. Более конкретно,

в настоящем изобретении предусмотрены молекулы гуманизированного CAR к ВСМА, и их применение для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности состояний, связанных с В-клетками.

Не желая быть связанным какой-либо конкретной теорией, изобретатели обнаружили, что определенные гуманизированные CAR к ВСМА вызывают антигеннезависимое («тоническое») высвобождение цитокинов, при чем эта характеристика делает гуманизированные CAR к ВСМА непригодными для применения в средствах Т-клеточной терапии. Удивительным образом авторы настоящего изобретения обнаружили, что тоническое высвобождение цитокинов определенными Т-клетками с гуманизированными CAR к ВСМА может происходить антигензависимым образом при изменении одной или нескольких характеристик по меньшей мере трансмембранного домена гуманизированных CAR к ВСМА.

В различных вариантах осуществления предусмотрен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий: внеклеточный домен, который содержит гуманизированное антитело к ВСМА (антиген созреваания В-клеток) или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают один или более эпитопов полипептида человеческого ВСМА; трансмембранный домен, один или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала и домен передачи первичного сигнала.

В конкретных вариантах осуществления гуманизированное антитело к ВСМА или антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид человеческого ВСМА, выбраны из группы, включающей верблюжий Ig, IgNAR, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)'2-фрагменты, F(ab)'3-фрагменты, Fv, одноцепочечное Fv-антитело («scFv»), бис-scFv, (scFv)2, минитело, диатело, триатело, тетратело, стабилизированный дисульфидными связями Fv-белок («dsFv») и однодоменное антитело (sdAb, нанотело).

В дополнительных вариантах осуществления гуманизированное антитело к ВСМА или антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид ВСМА, представляют собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат один или более CDR, изложенных под SEQ ID NO: 1-3.

В конкретных вариантах осуществления гуманизированное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат один или более CDR, изложенных под любым из SEQ ID NO: 4-6.

В определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 7-9.

В конкретных вариантах осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи содержит последовательности CDR, изложенные под SEQ ID NO: 1-3.

В других вариантах осуществления гуманизированное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 10-14.

В дополнительных вариантах осуществления последовательность вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательности CDR, изложенные под SEQ ID NO: 4-6.

В дополнительных вариантах осуществления трансмембранный домен получен из полипептида, выбранного из группы, включающей: альфа-, бета- или зета-цепь Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 и PD1.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получен из полипептида, выбранного из группы, включающей: CD8 α ; CD4, CD45, PD1 и CD152.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получен из PD1.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получен из CD152.

5 В определенных вариантах осуществления трансмембранный домен получен из CD8 α .

В конкретных вариантах осуществления один или более доменов передачи костимулирующего сигнала получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, включающей: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM),
10 CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70.

В конкретных вариантах осуществления один или более доменов передачи костимулирующего сигнала получены из костимулирующей молекулы, выбранной из
15 группы, включающей: CD28, CD134 и CD137.

В дополнительных вариантах осуществления один или более доменов передачи костимулирующего сигнала получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, включающей: CD28, CD134 и CD137.

В дополнительных вариантах осуществления один или более доменов передачи костимулирующего сигнала получены из CD28.
20

В конкретных вариантах осуществления один или более доменов передачи костимулирующего сигнала получены из CD134.

В других вариантах осуществления один или более доменов передачи костимулирующего сигнала получены из CD137.

25 В определенных вариантах осуществления CAR содержит полипептид шарнирной области.

В дополнительных вариантах осуществления шарнирная область получена из полипептида, выбранного из группы, включающей: CD8 α , PD1 и CD152.

В дополнительных вариантах осуществления полипептид шарнирной области
30 содержит шарнирную область PD1.

В дополнительных вариантах осуществления полипептид шарнирной области содержит шарнирную область CD152.

В дополнительных вариантах осуществления полипептид шарнирной области содержит шарнирную область CD8 α .

35 В дополнительных вариантах осуществления CAR содержит полипептид шарнирной области и трансмембранный домен из PD1.

В дополнительных вариантах осуществления CAR содержит полипептид шарнирной области и трансмембранный домен из CD152.

В дополнительных вариантах осуществления CAR содержит полипептид шарнирной
40 области и трансмембранный домен из CD8 α .

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит спейсерную область.

В дополнительных вариантах осуществления полипептид спейсерной области содержит области CH2 и CH3 из IgG1 или IgG4.

В конкретных вариантах осуществления CAR содержит сигнальный пептид.

45 В дополнительных вариантах осуществления сигнальный пептид предусматривает сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальный полипептид CD8 α или сигнальный пептид альфа-субъединицы рецептора GM-CSF человека.

В одном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную

последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 15-29, 71 и 73.

В другом варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15.

5 В конкретном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 16.

В определенном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 17.

В дополнительном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18.

10 В дополнительном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19.

В одном конкретном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20.

15 В одном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 21.

В другом варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 22.

В еще одном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 23.

20 В еще одном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 24.

В одном конкретном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 25.

25 В одном определенном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 26.

В одном дополнительном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27.

В одном дополнительном варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 28.

30 В другом варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 29.

В другом варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 71.

35 В другом варианте осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 73.

В различных вариантах осуществления предусмотрен полинуклеотид, кодирующий CAR, рассмотренный в данном документе.

40 В различных конкретных вариантах осуществления предусмотрен полинуклеотид, кодирующий CAR, при этом полинуклеотидная последовательность изложена под любым из SEQ ID NO: 30-44, 70 и 72.

В различных определенных вариантах осуществления предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий CAR, рассмотренный в данном документе или изложенный под любым из SEQ ID NO: 30-44, 70 и 72.

45 В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии.

В дополнительных вариантах осуществления вектор представляет собой эписомный вектор.

В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор.

В дополнительных вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор.

В других вариантах осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор.

В дополнительных вариантах осуществления лентивирусный вектор выбран из группы, по существу состоящей из: вируса иммунодефицита человека 1 (HIV-1); вируса иммунодефицита человека 2 (HIV-2); вируса висна-маэди (VMV); вируса артрита-энцефалита коз (CAEV); вируса инфекционной анемии лошадей (EIAV); вируса иммунодефицита кошек (FIV); вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV).

В конкретных вариантах осуществления вектор содержит левый (5') ретровирусный LTR, Psi (Ψ) сигнал упаковки, центральный полипуриновый тракт/ДНК-флэп (сPPT/FLAP), ретровирусный экспортный элемент, промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим CAR, рассмотренный в данном документе; и правый (3') ретровирусный LTR.

В других вариантах осуществления CAR содержит гетерологичную последовательность полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

В определенных вариантах осуществления промотор 5' LTR замещен гетерологичным промотором.

В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный промотор представляет собой промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV) или промотор вируса обезьян 40 (SV40).

В конкретных вариантах осуществления 5' LTR или 3' LTR представляют собой LTR лентивируса.

В конкретных вариантах осуществления 3' LTR содержит одну или более модификаций.

В некоторых вариантах осуществления 3' LTR содержит одну или более делеций.

В определенных вариантах осуществления 3' LTR представляет собой самоинактивирующийся (SIN) LTR.

В некоторых вариантах осуществления последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста или сигнальную последовательность полиаденилирования β -глобина кролика.

В дополнительных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий CAR, рассмотренный в данном документе, содержит оптимизированную последовательность Козак.

В дополнительных вариантах осуществления промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим CAR, рассмотренный в данном документе, выбран из группы, включающей: промотор немедленно-раннего гена цитомегаловируса (CMV), промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1- α), промотор фосфолипидкиназы-1 (PGK), промотор убиквитина-С (UBQ-С), промотор из энхансера цитомегаловируса/промотора куриного бета-актина (CAG), промотор из энхансера полиомавируса/промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса (MC1), промотор бета-актина (β -ACT), промотор вируса обезьян 40 (SV40) и промотор (MND) с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы, с удаленным участком отрицательного контроля, с сайтом связывания праймера, замещенным на последовательность из dl587rev.

В различных вариантах осуществления предусмотрена иммунная эффекторная клетка,

содержащая вектор, рассмотренный в данном документе.

В дополнительных вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка выбрана из группы, включающей: Т-лимфоцит и естественную клетку-киллер (NK).

В различных вариантах осуществления предусмотрена композиция, содержащая
5 иммунную эффекторную клетку, рассмотренную в данном документе, и физиологически приемлемый наполнитель.

В различных вариантах осуществления предусмотрен способ получения иммунной эффекторной клетки, содержащей CAR, рассмотренный в данном документе, включающий введение в иммунную эффекторную клетку вектора, содержащего
10 полинуклеотид, кодирующий CAR.

В дополнительных вариантах осуществления способ дополнительно включает стимуляцию иммунной эффекторной клетки и индукцию клетки к пролиферации посредством приведения клетки в контакт с антителами, которые связывают CD3, и антителами, которые связываются с CD28, с получением тем самым популяции иммунных
15 эффекторных клеток.

В конкретных вариантах осуществления иммунную эффекторную клетку стимулируют и индуцируют к пролиферации до введения вектора.

В определенных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки предусматривают Т-лимфоциты.

В конкретных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки
20 предусматривают НК-клетки.

В различных вариантах осуществления предусмотрен способ лечения состояния, связанного с В-клетками, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей Т-клетки
25 с CAR к ВСМА, рассмотренным в данном документе, и необязательно фармацевтически приемлемый наполнитель.

В других вариантах осуществления состояние, связанное с В-клетками, представляет собой множественную миелому, неходжкинскую лимфому, формы пролиферации В-клеток с неопределенным злокачественным потенциалом, лимфогранулематоз,
30 посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, иммунорегуляторное нарушение, ревматоидный артрит, миастению гравис, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, антифосфолипидный синдром, болезнь Чагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, нодозный полиартериит, синдром Шегрена, обыкновенную пузычатку, склеродермию, рассеянный склероз, антифосфолипидный
35 синдром, ANCA-ассоциированный васкулит, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемию и быстро прогрессирующий гломерулонефрит, болезнь тяжелых цепей, первичный или иммуноцит-ассоциированный амилоидоз или моноклональную гаммапатию неясного генеза.

В дополнительных вариантах осуществления состояние, связанное с В-клетками,
40 представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

В определенных вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому (MM) или неходжкинскую лимфому (NHL).

В определенных вариантах осуществления MM выбрана из группы, включающей:
45 клинически выраженную множественную миелому, вялотекущую множественную миелому, плазмочитарный лейкоз, несекреторную миелому, IgD-миелому, остеосклеротическую миелому, солитарную плазмочитому кости и экстрамедуллярную плазмочитому.

В некоторых вариантах осуществления NHL выбрана из группы, включающей: лимфому Беркитта, хронический лимфолейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (CLL/SLL), диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, лимфобластную лимфому из В-клеток-предшественников и лимфому из клеток мантийной зоны.

В конкретных вариантах осуществления состояние, связанное с В-клетками, представляет собой плазмочитарное злокачественное новообразование.

В дополнительных вариантах осуществления состояние, связанное с В-клетками, представляет собой аутоиммунное заболевание.

В дополнительных вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку.

В определенных вариантах осуществления состояние, связанное с В-клетками, представляет собой ревматоидный артрит.

В конкретных вариантах осуществления состояние, связанное с В-клетками, представляет собой идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, или миастению гравис, или аутоиммунную гемолитическую анемию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ АСПЕКТОВ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1 изображена схема конструкций с гуманизированным CAR к антигену созреваия В-клеток (anti-BCMA).

На фигуре 2 показано количество IFN γ , высвобожденного из Т-клеток с CAR к BCMA после того, как эти клетки совместно культивировали в течение 24 часов с клетками K562, экспрессирующими BCMA.

На фигуре 3 показана цитолитическая активность Т-клеток с CAR к BCMA при совместном культивировании в течение четырех часов с клетками K564, экспрессирующими BCMA.

На фигуре 4 показана экспрессия CAR к BCMA в Т-клетках, трансдуцированных с помощью последовательностей мышиноного CAR (anti-BCMA-02) или гуманизированного CAR (anti-BCMA-10, anti-BCMA-11, anti-BCMA-31).

На фигуре 5 показано количество IFN γ , высвобожденного из Т-клеток с CAR к BCMA после того, как эти клетки культивировали в течение 24 часов с клетками K562-BCMA, экспрессирующими низкие или высокие количества BCMA, клеточными линиями множественной миеломы (RPMI-8226, NCI-H929) или BCMA-негативными клеточными линиями (K562, HDLM-2).

На фигуре 6 показана цитолитическая активность Т-клеток, экспрессирующих CAR к BCMA, которые совместно культивировали с клетками K564-BCMA в течение четырех часов.

На фигуре 7 показано антигеннезависимое высвобождение цитокинов Т-клетками, экспрессирующими конструкцию с гуманизированным CAR, anti-BCMA-10, которые культивировали в среде, содержащей человеческую сыворотку, но в отсутствие BCMA.

На фигуре 8 показано антигеннезависимое высвобождение цитокина Т-клетками, экспрессирующими конструкцию с гуманизированным CAR, anti-BCMA-10, которые культивировали в среде, содержащей человеческую сыворотку, но в отсутствие BCMA.

На фигуре 9 показаны схема конструкций с CAR, anti-BCMA-02, anti-BCMA-10, anti-BCMA-10.2 и anti-BCMA-10.5.

На фигуре 10 показано количество IFN γ , высвобожденного из Т-клеток с CAR anti-BCMA-10, anti-BCMA-10.2 или anti-BCMA-10.5 после того, как клетки совместно культивировали в течение 24 часов с клетками K562, экспрессирующими BCMA.

На фигуре 11 показано сравнение количества тонического высвобождения IFN γ из Т-клеток, экспрессирующих мышинный CAR, anti-BCMA-02, или экспрессирующих гуманизированный CAR, anti-BCMA-10, anti-BCMA-10.2 или anti-BCMA-10.5, после 24 часов культивирования.

5 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИДЕНТИФИКАТОРОВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Под SEQ ID NO: 1-3 изложены аминокислотные последовательности иллюстративных последовательностей CDR легкой цепи для CAR к BCMA, рассмотренных в данном документе.

10 Под SEQ ID NO: 4-6 изложены аминокислотные последовательности иллюстративных последовательностей CDR тяжелой цепи для CAR к BCMA, рассмотренных в данном документе.

Под SEQ ID NO: 7-9 изложены аминокислотные последовательности иллюстративных последовательностей легкой цепи для CAR к BCMA, рассмотренных в данном документе.

15 Под SEQ ID NO: 10-14 изложены аминокислотные последовательности иллюстративных последовательностей тяжелой цепи для CAR к BCMA, рассмотренных в данном документе.

Под SEQ ID NO: 15-29, 71 и 73 изложены аминокислотные последовательности иллюстративных CAR к BCMA, рассмотренных в данном документе.

20 Под SEQ ID NO: 30-44, 70 и 72 изложены полинуклеотидные последовательности, которые кодируют иллюстративные CAR к BCMA, рассмотренные в данном документе.

Под SEQ ID NO: 45 изложена аминокислотная последовательность человеческого BCMA.

Под SEQ ID NO: 46-56 изложена аминокислотная последовательность различных линкеров.

25 Под SEQ ID NO: 57-69 изложена аминокислотная последовательность сайтов расщепления для протеазы и сайтов расщепления для саморасщепляющегося полипептида.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

А. Обзор

30 Настоящее изобретение в целом относится к улучшенным композициям и способам лечения состояний, связанных с В-клетками. Используемый в данном документе термин «состояния, связанные с В-клетками» относится к состояниям, в которые вовлечена ненормальная В-клеточная активность и В-клеточные злокачественные новообразования.

35 В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к улучшенной адоптивной клеточной терапии состояний, связанных с В-клетками, с применением генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток. Генетические подходы предлагают потенциальные средства усиления иммунного распознавания и элиминации раковых клеток. Одна перспективная стратегия 40 представляет собой создание методами генной инженерии иммунных эффекторных клеток для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR), которые перенаправляют цитотоксичность на раковые клетки. Однако, существующие средства адоптивной клеточной иммунотерапии для лечения В-клеточных нарушений представляют серьезный риск ослабления гуморального иммунитета, поскольку целевые 45 антигены этих клеток экспрессируются на всех или на большинстве В-клеток.

Соответственно, такие методы терапии не являются оптимальными с клинической точки зрения и, таким образом, в данной области техники остается потребность в более эффективных способах терапии состояний, связанных с В-клетками, которые щадили

бы гуморальный иммунитет.

Улучшенные композиции и способы адоптивной клеточной терапии, раскрытые в данном документе, предусматривают генетически модифицированные иммунные эффектор-
 5 ные клетки, которые можно легко размножить, которые проявляют долгосрочную персистенцию *in vivo* и уменьшают нарушение гуморального иммунитета путем нацеливания на В-клетки, экспрессирующие антиген созревания В-клеток (BCMA, также известный как CD269 или представитель 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли; TNFRSF17).

BCMA является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли см., например, Thompson et al., J. Exp. Medicine, 192(1): 129-135, 2000, и Mackay et al., Annu. Rev.Immunol, 21: 231-264, 2003. BCMA связывает фактор активации В-клеток (BAFF) и лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL) (см., например, Mackay et al., 2003 и Kalled et al., Immunological Reviews, 204: 43-54, 2005). Среди доброкачественных клеток, как сообщалось, BCMA экспрессируется преимущественно на плазмочитах и
 15 субпопуляциях зрелых В-клеток (см., например, Laabi et al., EMBO J., 77(1): 3897-3904, 1992; Laabi et al., Nucleic Acids Res., 22(7): 1147-1154, 1994; Kalled et al., 2005; O'Connor et al., J. Exp. Medicine, 199(1): 91-97, 2004; и Ng et al., J. Immunol., 73(2): 807-817, 2004. Мыши с дефицитом BCMA являются здоровыми и имеют нормальное количество В-клеток, но срок жизни их долгоживущих плазмочитов уменьшен (см., например, O'Connor et al.,
 20 2004; Xu et al., Mol. Cell. Biol, 21(12): 4067-4074, 2001; и Schiemann et al., Science, 293(5537): 2 111-21 14, 2001). РНК BCMA была обнаружена повсеместно в клетках множественной миеломы и других форм лимфомы, а белки BCMA были обнаружены на поверхности плазмочитов у пациентов с множественной миеломой несколькими исследователями (см., например, Novak et al., Blood, 103(2): 689-694, 2004; Neri et al., Clinical Cancer Research,
 25 73(19): 5903-5909, 2007; Bellucci et al., Blood, 105(10): 3945-3950, 2005; и Moreaux et al., Blood, 703(8): 3148-3157, 2004.

В различных вариантах осуществления CAR, содержащие последовательности гуманизированного антитела к BCMA, являются высокоэффективными по сравнению с CAR к BCMA, содержащими последовательности мышинного антитела; подвергаются
 30 активному размножению *in vivo*; а также распознают человеческие В-клетки, экспрессирующие BCMA, и проявляют цитотоксическую активность в отношении В-клеток, экспрессирующих BCMA. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что существенно модифицированные части последовательностей мышинного антитела к человеческому BCMA, в том числе структурные и минорные домены
 35 распознавания антигена, существенно не изменяли функций Т-клеток с гуманизированным CAR к BCMA, и что свойства высвобождения цитокинов у Т-клеток с гуманизированным CAR к BCMA можно увеличивать или уменьшать по сравнению с Т-клеткой, экспрессирующей эталонный гуманизированный CAR к BCMA, путем
 40 изменения по меньшей мере трансмембранного домена гуманизированного CAR к BCMA.

В конкретных вариантах осуществления применение гуманизированного CAR к BCMA приводит к неожиданно высокому антигеннезависимому или тоническому высвобождению цитокинов. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен гуманизированного CAR к BCMA, вызывающий антигеннезависимое
 45 высвобождение цитокинов, изменен таким образом, что свойства передачи сигнала (например, высвобождение цитокинов) у Т-клеток с измененным гуманизированным CAR к BCMA становятся в существенной степени антигензависимыми по сравнению с Т-клеткой, экспрессирующей неизмененный гуманизированный CAR к BCMA.

В определенных вариантах осуществления трансмембранный домен гуманизированного CAR к ВСМА, вызывающий антигеннезависимое высвобождение цитокинов, изменен таким образом, что Т-клетки с измененным гуманизированным CAR к ВСМА становятся в существенной степени антигензависимыми или высвобождают существенно меньшее количество цитокинов в отсутствие антигена по сравнению с Т-клеткой, экспрессирующей неизмененный гуманизированный CAR к ВСМА.

В одном варианте осуществления предусмотрен CAR, содержащий гуманизированное антитело к ВСМА или антигенсвязывающий фрагмент, трансмембранный домен и один или более внутриклеточных доменов передачи сигнала.

В одном варианте осуществления предусмотрена иммунная эффекторная клетка, которую генетически модифицируют для экспрессии CAR, рассмотренного в данном документе. В данном документе Т-клетки, экспрессирующие CAR, называют CAR-Т-клетки или CAR-модифицированные Т-клетки.

В различных вариантах осуществления генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассмотренные в данном документе, вводят пациенту, имеющему состояние, связанное с В-клетками, например, аутоиммунное заболевание, ассоциированное с В-клетками, или В-клеточное злокачественное новообразование.

При осуществлении настоящего изобретения на практике будут использоваться, если не указано иное, традиционные методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, методики рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, находящиеся в пределах компетенции специалистов в данной области, многие из которых описаны ниже с целью иллюстрации. Такие методики в полном объеме объясняются в литературе. См., например, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, дополнено в июле 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; а также монографии в журналах, таких как *Advances in Immunology*.

В. Определения

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое общеизвестно обычным специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при осуществлении настоящего изобретения на практике или при его тестировании могут быть использованы любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, предпочтительные варианты осуществления композиций, способов и материалов описаны в данном документе. Для целей настоящего изобретения ниже определены следующие термины.

Формы единственного и множественного числа, используемые в данном документе, обозначают один или несколько (т. е. по меньшей мере один или один или более) грамматических объектов предмета. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или один или более элементов.

Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как обозначение какой-либо одной, обеих или любой комбинации из альтернатив.

Термин «и/или» следует понимать как какую-либо одну или обе из альтернатив.

Используемый в данном документе термин «приблизительно» или «примерно»
 5 относится к количеству, уровню, значению, числу, частоте, процентной доле, измерению, размеру, величине, весу или длине, которые варьируют в пределах 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% относительно эталонного количества, уровня, значения, числа, частоты, процентной доли, измерения, размера, величины, веса или длины. В одном варианте осуществления термин «приблизительно» или «примерно» относится
 10 к диапазону количества, уровня, значения, числа, частоты, процентной доли, измерения, размера, величины, веса или длины, составляющему $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ или $\pm 1\%$ относительно эталонного количества, уровня, значения, числа, частоты, процентной доли, измерения, размера, величины, веса или длины.

15 На протяжении настоящего описания, если контекст не требует иного, слова «содержат», «содержит» и «содержащий» следует понимать как подразумевающие включение указанной стадии, или элемента, или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии, или элемента, или группы стадий или элементов. Под «состоящий из» подразумевается включение и ограничение тем, что следует за
 20 фразой «состоящий из». Таким образом, фраза «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Под «по существу состоящий из» подразумевают включение любых элементов, перечисленных после данной фразы, и ограничение другими элементами, которые не препятствуют активности или действию,
 25 указанным в настоящем раскрытии в отношении перечисленных элементов, или способствуют им. Таким образом, фраза «по существу состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и что не могут присутствовать другие элементы, оказывающие существенное негативное влияние на активность или действие перечисленных элементов.

30 Ссылка на протяжении настоящего описания на «один вариант осуществления», «вариант осуществления», «конкретный вариант осуществления», «сходный вариант осуществления», «определенный вариант осуществления», «дополнительный вариант осуществления» или «еще один вариант осуществления» или их комбинации означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с данным
 35 вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один из вариантов осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление всех вышеприведенных фраз в различных местах на протяжении настоящего описания не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Более того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым
 40 подходящим образом в одном или более вариантах осуществления. Следует также понимать, что явное упоминание признака в одном варианте осуществления служит основанием для исключения данного признака в конкретном варианте осуществления.

С. Химерные антигенные рецепторы

В различных вариантах осуществления предусмотрены полученные методами генной
 45 инженерии рецепторы, которые перенаправляют цитотоксичность иммунных эффекторных клеток в направлении В-клеток. Такие полученные методами генной инженерии рецепторы в данном документе называют химерными антигенными рецепторами (CAR). CAR представляют собой молекулы, в которых объединена

специфичность антитела к необходимому антигену (например, ВСМА) с внутриклеточным активирующим доменом Т-клеточного рецептора с получением химерного белка, который проявляет специфическую клеточную иммунную активность против ВСМА. Используемый в данном документе термин «химерный» обозначает

5 составленный из частей различных белков или ДНК из различных источников. CAR, рассмотренные в данном документе, содержат внеклеточный домен (также называемый связывающий домен или антигенспецифический связывающий домен), который связывается с ВСМА, трансмембранный домен и внутриклеточный домен передачи сигнала. Сцепление антиген ВСМАсвязывающего домена CAR с ВСМА на

10 поверхности целевой клетки приводит к образованию кластеров из CAR и доставляет стимул активации в CAR-содержащие клетки. Основной характеристикой CAR является их способность перенаправлять специфичность иммунной эффекторной клетки, запуская тем самым пролиферацию, продукцию цитокинов, фагоцитоз или продукцию молекул, которые могут опосредовать клеточную гибель клетки, экспрессирующей целевой

15 антиген, независимым от главного комплекса гистосовместимости (МНС) способом, с использованием специфических в отношении клетки нацеливающих способностей моноклональных антител, растворимых лигандов или специфических в отношении клетки корецепторов.

В различных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный связывающий

20 домен, который содержит гуманизированный ВСМА-специфический связывающий домен; трансмембранный домен; один или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала; и домен передачи первичного сигнала.

В конкретных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный связывающий домен, который содержит гуманизированное антитело к ВСМА или его

25 антигенсвязывающий фрагмент; один или более шарнирных доменов или спейсерных доменов; трансмембранный домен; один или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала и домен передачи первичного сигнала.

1. Связывающий домен

В конкретных вариантах осуществления CAR, рассмотренные в данном документе,

30 содержат внеклеточный связывающий домен, который содержит гуманизированное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с полипептидом человеческого ВСМА, экспрессируемым на В-клетке. Используемые в данном документе термины «связывающий домен», «внеклеточный домен», «внеклеточный связывающий домен», «антигенспецифический связывающий

35 домен» и «внеклеточный антигенспецифический связывающий домен» являются взаимозаменяемыми и предусматривают CAR с возможностью специфически связываться с целевым антигеном, представляющим интерес, например ВСМА. Связывающий домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

Используемые в данном документе термины «аффинность специфического связывания», или «специфически связывает», или «специфически связанный», или «специфическое связывание», или «специфически нацеливает» описывают связывание антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента (или CAR, содержащего

40 вышеуказанное) с ВСМА с большей аффинностью связывания, чем фоновое связывание. Связывающий домен (или CAR, содержащий связывающий домен, или белок слияния, содержащий связывающий домен) «специфически связывается» с ВСМА, если он связывается или ассоциирует с ВСМА с аффинностью или K_d (т. е. равновесная константа ассоциации конкретного взаимодействия связывания в единицах 1/М), например, большей

или равной приблизительно 10^5 M^{-1} . В определенных вариантах осуществления связывающий домен (или белок слияния на его основе) связывается с мишенью с K_a , большей или равной приблизительно 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , 10^{12} M^{-1} или 10^{13} M^{-1} . Связывающими доменами (или одноцепочечными белками слияния на их основе) с «высокой аффинностью» называют связывающие домены с K_a , составляющей по меньшей мере 10^7 M^{-1} , по меньшей мере 10^8 M^{-1} , по меньшей мере 10^9 M^{-1} , по меньшей мере 10^{10} M^{-1} , по меньшей мере 10^{11} M^{-1} , по меньшей мере 10^{12} M^{-1} , по меньшей мере 10^{13} M^{-1} или более.

В качестве альтернативы аффинность можно определить как равновесную константу диссоциации (K_d) конкретного взаимодействия связывания в единицах М (например, от 10^{-5} M до 10^{-13} M или менее). Аффинность полипептидов связывающего домена и CAR-белков согласно настоящему раскрытию можно легко определить с применением традиционных методик, например, с помощью конкурентного анализа ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа), или анализов ассоциации связывания или замещения с применением меченых лигандов, или с применением устройства для поверхностного плазмонного резонанса, такого как Biacore T100, доступного от компании Biacore, Inc., Писктавей, Нью-Джерси, или технологии оптического биосенсора, такой как система EPIC или EnSpire, доступных от компании Corning и Perkin Elmer, соответственно (см. также, например, Scatchard et al. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; патенты США №№ 5283173; 5468614 или аналогичные).

В одном варианте осуществления аффинность специфического связывания приблизительно в 2 раза превышает аффинность фонового связывания, приблизительно в 5 раз превышает аффинность фонового связывания, приблизительно в 10 раз превышает аффинность фонового связывания, приблизительно в 20 раз превышает аффинность фонового связывания, приблизительно в 50 раз превышает аффинность фонового связывания, приблизительно в 100 раз превышает аффинность фонового связывания или приблизительно в 1000 раз превышает аффинность фонового связывания или больше.

В конкретных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен CAR содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Термин «антитело» относится к связывающему агенту, который представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере вариабельную область легкой цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина, которая специфически распознает и связывает эпитоп антигена, такого как пептид, липид, полисахарид или нуклеиновая кислота, содержащие антигенную детерминанту, распознаваемую иммунной клеткой.

«Антиген (Ag)» относится к соединению, композиции или веществу, которое может стимулировать выработку антител или Т-клеточный ответ у животного, в том числе к композициям (таким как композиция, содержащая опухолеспецифический белок), которые инъецируют животному или поглощаются животным. Антиген реагирует с продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, в том числе с теми, которые были индуцированы под действием гетерологичных антигенов, таких как раскрытые антигены. В конкретных вариантах осуществления целевой антиген представляет собой эпитоп полипептида ВСМА.

«Эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к области антигена, с которой связывается связывающий агент. Эпитопы могут быть образованы как из смежных

аминокислот, так и несмежных аминокислот, сближенных за счет третичной структуры белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной структурой, как правило, пропадают при обработке денатурирующими
 5 растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3, чаще по меньшей мере 5, приблизительно 9 или приблизительно 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты, такие как верблужий Ig, IgNAR, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)'2-фрагменты, F(ab)'3-фрагменты, Fv,
 10 одноцепочечные Fv-белки («scFv»), бис-scFv, (scFv)₂, минитела, диатела, триатела, тетратела, стабилизированные дисульфидными связями Fv-белки («dsFv») и однодоменное антитело (sdAb, нанотело) и части антител полной длины, ответственные за связывание антигена. Термин также включает полученные методами генной инженерии формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные
 15 мышинные антитела), гетероконъюгатные антитела (такие как, биспецифические антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты. См. также Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Рокфорд, Иллинойс); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997.

Как будет понятно специалисту в данной области и как описано в других частях
 20 данного документа, полное антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области и первой, второй и третьей константной области, в то время как каждая легкая цепь состоит из вариабельной области и константной области. Тяжелые цепи антитела млекопитающих классифицируют как α , δ , ϵ , γ и μ . Легкие цепи антитела млекопитающих классифицируют
 25 как λ или κ . Иммуноглобулины, содержащие тяжелые цепи α , δ , ϵ , γ и μ классифицируют как иммуноглобулин (Ig)A, IgD, IgE, IgG и IgM. Полное антитело имеет Y-образную форму. Стебель Y состоит из второй и третьей константных областей (а в случае IgE и IgM, четвертой константной области) двух тяжелых цепей, связанных между собой, а дисульфидные связи (между цепями) образованы в шарнирной области. Тяжелые цепи
 30 γ , α и δ содержат константную область, состоящую из трех последовательных (расположенных в линию) доменов Ig, и шарнирную область для придания гибкости; тяжелые цепи μ и ϵ содержат константную область, состоящую из четырех доменов иммуноглобулина. Вторая и третья константные области называются «CH2-домен» и «CH3-домен» соответственно. Каждое плечо Y включает вариабельную область и
 35 первую константную область одной тяжелой цепи, связанные с вариабельной и константными областями одной легкой цепи. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей отвечают за связывание антигена.

Вариабельные области легкой и тяжелой цепей содержат «каркасную область», прерываемую тремя гипервариабельными участками, также называемыми
 40 «определяющие комплементарность участки» или «CDR». CDR можно определять или идентифицировать с помощью традиционных способов, например, с помощью последовательности согласно Kabat и др. (Wu, TT and Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987); (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991,
 45 которая тем самым включена посредством ссылки), или с помощью структуры согласно Chothia и др. (Chothia, C. and Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196(4): 901-917 (1987), Chothia, C. et al, Nature, 342: 877 - 883 (1989)).

Последовательности каркасных участков различных легких или тяжелых цепей

относительно консервативны в пределах вида, такого как человек. Каркасный участок антитела, который представляет собой объединенные каркасные участки составляющих антитело легкой и тяжелой цепей, служит для регуляции положения и выравнивания CDR в трехмерном пространстве. CDR ответственны прежде всего за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой цепи, как правило, называются CDR1, CDR2 и CDR3, нумеруются последовательно, начиная с N-конца, а также, как правило, идентифицируются с помощью цепи, в которой расположен конкретный CDR. Таким образом, CDR, расположенные в переменном домене тяжелой цепи антитела, называются CDRH1, CDRH2 и CDRH3, тогда как CDR, расположенные в переменном домене легкой цепи антитела, называются CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Антитела с различной специфичностью (т. е. различными паратопами для различных антигенов) имеют разные CDR. Несмотря на то, что CDR варьируют от антитела к антителу, только ограниченное количество аминокислотных положений в пределах CDR непосредственно вовлечено в связывание антигена. Такие положения в пределах CDR называют определяющими специфичность остатками (SDR). Иллюстративные примеры CDR легкой цепи, которые являются пригодными для конструирования гуманизированных CAR к ВСМА, рассмотренных в данном документе, включают без ограничений последовательности CDR, изложенные под SEQ ID NO: 1-3. Иллюстративные примеры CDR тяжелой цепи, которые являются пригодными для конструирования гуманизированных CAR к ВСМА, рассмотренных в данном документе, включают без ограничений последовательности CDR, изложенные под SEQ ID NO: 4-6.

Ссылки на «V_H» или «VH» относятся к переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина, в том числе таковой антитела, Fv, ScFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела, раскрываемых в данном документе. Ссылки на «V_L» или «VL» относятся к переменной области легкой цепи иммуноглобулина, в том числе таковой антитела, Fv, ScFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела, раскрываемых в данном документе.

«Моноклональное антитело» представляет собой антитело, вырабатываемое одним клоном В-лимфоцитов или клеткой, в которую были трансфицированы гены легкой и тяжелой цепи одного антитела. Моноклональные антитела получают с помощью способов, известных специалистам в данной области, например, посредством создания образующих антитела гибридных клеток путем слияния клеток миеломы с иммунными клетками селезенки. Моноклональные антитела включают гуманизированные моноклональные антитела.

«Химерное антитело» содержит каркасные остатки от одного вида, такого как человек, и CDR (которые в целом обуславливают связывание антигена) от другого вида, такого как мышь. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления CAR, рассмотренный в данном документе, содержит антигенспецифический связывающий домен, который представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В предпочтительных вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело (такое как гуманизированное моноклональное антитело) или его фрагмент, которые специфически связываются с полипептидом человеческого ВСМА. «Гуманизированное» антитело представляет собой иммуноглобулин, включающий человеческий каркасный участок и один или более CDR из не являющегося человеческим иммуноглобулина (например, мышинного, крысиного или синтетического). Не являющийся человеческим иммуноглобулин, из которого происходят CDR, называют «донором», а человеческий иммуноглобулин, из которого происходит каркас, называют

«акцептором». В одном варианте осуществления все CDR в гуманизированном иммуноглобулине происходят из донорного иммуноглобулина. Константные участки могут и не присутствовать, однако, если они имеются, они должны быть практически идентичными константным участкам человеческих иммуноглобулинов, т. е. быть по меньшей мере на приблизительно 85-90%, на приблизительно 95% или более идентичными. Следовательно, все части гуманизированного иммуноглобулина, за исключением, возможно, CDR, практически идентичны соответствующим частям последовательностей встречающихся в природе человеческих иммуноглобулинов. Гуманизированные или другие моноклональные антитела могут иметь дополнительные консервативные аминокислотные замены, которые не оказывают существенного влияния на связывание антигена или другие функции иммуноглобулина. Гуманизированные антитела могут быть сконструированы при помощи методов генной инженерии (см., например, патент США № 5585089).

В конкретных вариантах осуществления гуманизированное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент включают без ограничения верблюжий Ig (антитело верблюдовых (VHH)), IgNAR, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)'2-фрагменты, F(ab)'3-фрагменты, Fv, одноцепочечное Fv-антитело («scFv»), бис-scFv, (scFv)₂, минитело, диатело, триатело, тетратело, стабилизированный дисульфидными связями Fv-белок («dsFv») и однодоменное антитело (sdAb, нанотело).

«Верблюжий Ig» или «VHH-антитело верблюдовых», используемые в данном документе, относятся к наименьшей известной антигенсвязывающей единице из антитела, состоящего только из тяжелых цепей (Koch-Nolte, et al, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Термины «антитело, состоящее только из тяжелых цепей» или «антитело верблюдовых» относятся к антителу, которое содержит два VH-домена и не содержит легких цепей (Riechmann L. et al, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; патент США № 6005079).

«IgNAR» или «новый иммуноглобулиновый антигенный рецептор» относится к классу антител из иммунного спектра акул, которые состоят из гомодимеров из одного переменного домена нового антигенного рецептора (VNAR) и пяти константных доменов нового антигенного рецептора (CNAR). IgNAR представляют собой одни из самых маленьких известных иммуноглобулиновых белковых каркасов, и они характеризуются высокой стабильностью и обладают характеристиками для эффективного связывания. Внутренняя стабильность может быть связана как с (i) лежащим в основе каркасом Ig, который представлен значительным количеством заряженных и гидрофильных находящихся на поверхности остатков, по сравнению со стандартными VH- и VL-доменами антитела, встречающимися у мышинных антител; так и с (ii) особенностями стабилизации структуры петель из определяющих комплементарность участков (CDR), в том числе дисульфидными мостиками внутри петель и характером водородных связей внутри петель.

Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагменты, каждый с одним антигенсвязывающим сайтом, и оставшийся «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает F(ab')₂-фрагмент, который имеет два антигенсвязывающих сайта, и все еще способен к перекрестному связыванию антигена.

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенсвязывающий сайт. В одном варианте осуществления молекула двуцепочечного Fv предусматривает димер из одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи, объединенных прочной, нековалентной связью. В

молекуле одноцепочечного Fv (scFv) один переменный домен тяжелой цепи и один переменный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны посредством гибкого пептидного линкера, так что легкая и тяжелая цепи могут объединяться в «димерную» структуру, аналогичную таковой у молекулы двуцепочечного Fv. Именно в этой конфигурации три гиперпеременных участка (HVR) каждого переменного домена взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего сайта на поверхности димера из VH-VL. В совокупности эти шесть HVR обуславливают антигенсвязывающую специфичность антитела. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфических в отношении антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный связывающий сайт.

Fab-фрагмент содержит переменные домены тяжелой и легкой цепи, а также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбокси-конце CH1-домена тяжелой цепи, включающих один или более цистеиновых остатков из шарнирной области антитела. Fab'-SH в данном документе обозначает Fab', в котором цистеиновый остаток(и) константных доменов имеет свободную тиольную группу. F(ab')₂-фрагменты антитела первоначально были получены как пары из Fab'-фрагментов, которые имеют связанные цистеиновые остатки шарнирной области.

Также известны другие средства для химического связывания фрагментов антител.

Термин «диатела» относится к фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами, при этом фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одну полипептидную цепь (VH-VL). При применении линкера, который является слишком коротким, чтобы допустить образование пары между двумя доменами одной цепи, домены вынуждены образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела могут быть бивалентными или биспецифическими. Более полно диатела описаны, например, в EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); и Hollinger et al., *PNAS USA* 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

«Однодоменное антитело», или «sdAb», или «нанотело» относится к фрагменту антитела, который состоит из переменной области тяжелой цепи антитела (VH-домен) или переменной области легкой цепи антитела (VL-домен) (Holt, L., et al, *Trends in Biotechnology*, 21(11): 484-490).

«Одноцепочечные Fv» или «scFv»-фрагменты антитела содержат VH- и VL-домены антитела, где указанные домены присутствуют в одной полипептидной цепи и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между VH- и VL-доменами, который обеспечивает возможность scFv образовать структуру, необходимую для связывания антигена. Обзор scFv см., например, Pluckthün, в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

В предпочтительных вариантах осуществления CAR, рассмотренный в данном документе, содержит антигенспецифический связывающий домен, который представляет собой scFv и может быть мышиным, человеческим или гуманизированным scFv.

Одноцепочечные антитела могут быть клонированы из генов V-области гибридом, специфических в отношении требуемой мишени. Получение таких гибридом стало традиционным. Методика, которую можно применять для клонирования переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), была описана,

например, в Orlandi et al., PNAS, 1989; 86: 3833-3837.

В конкретных вариантах осуществления антигенспецифический связывающий домен представляет собой гуманизированный scFv, который связывает полипептид человеческого ВСМА. Иллюстративные примеры переменных областей тяжелых цепей, которые являются пригодными для конструирования CAR к ВСМА, рассмотренных в данном документе, включают без ограничения аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 10-14. Иллюстративные примеры переменных областей легких цепей, которые являются пригодными для конструирования CAR к ВСМА, рассмотренных в данном документе, включают без ограничения аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 7-9.

Примером гуманизированного ВСМА-специфического связывающего домена является переменная область иммуноглобулина, специфическая в отношении ВСМА, которая содержит по меньшей мере один человеческий каркасный участок. Термин «человеческий каркасный участок» относится к каркасному участку дикого типа (т. е. встречающемуся в природе) переменной области человеческого иммуноглобулина, измененному каркасному участку переменной области человеческого иммуноглобулина, если менее приблизительно 50% (например, предпочтительно менее приблизительно 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%) аминокислот в данном участке удалены или замещены (например, одним или более аминокислотными остатками из каркасного участка иммуноглобулина, не являющегося человеческим, в соответствующих положениях), или измененному каркасному участку переменной области иммуноглобулина, не являющегося человеческим, если менее приблизительно 50% (например, менее 45%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% и 5%) аминокислот в данном участке удалены или замещены (например, в положениях находящихся на поверхности остатков и/или одним или более аминокислотными остатками из каркасного участка человеческого иммуноглобулина в соответствующих положениях), таким образом в одном аспекте иммуногенность является сниженной.

В определенных вариантах осуществления человеческий каркасный участок представляет собой каркасный участок дикого типа из переменной области человеческого иммуноглобулина. В других определенных вариантах осуществления человеческий каркасный участок представляет собой измененный каркасный участок из переменной области человеческого иммуноглобулина с аминокислотными делециями или заменами в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более положениях. В других вариантах осуществления человеческий каркасный участок представляет собой измененный каркасный участок из переменной области иммуноглобулина, не являющегося человеческим, с аминокислотными делециями или заменами в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более положениях.

В конкретных вариантах осуществления ВСМА-специфический связывающий домен содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь человеческих каркасных участков (FR), выбранных из человеческого FR1 легкой цепи, человеческого FR1 тяжелой цепи, человеческого FR2 легкой цепи, человеческого FR2 тяжелой цепи, человеческого FR3 легкой цепи, человеческого FR3 тяжелой цепи, человеческого FR4 легкой цепи и человеческого FR4 тяжелой цепи.

Человеческие FR, которые могут присутствовать в ВСМА-специфических связывающих доменах, также включают варианты примеров FR, предусмотренных в данном документе, в которых одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более аминокислот из примеров FR были замещены или удалены.

В определенных вариантах осуществления гуманизированный ВСМА-специфический связывающий домен содержит (а) гуманизированную переменную область легкой цепи, которая содержит человеческий FR1 легкой цепи, человеческий FR2 легкой цепи, человеческий FR3 легкой цепи и человеческий FR4 легкой цепи, и (b) гуманизированную переменную область тяжелой цепи, которая содержит человеческий FR1 тяжелой цепи, человеческий FR2 тяжелой цепи, человеческий FR3 тяжелой цепи и человеческий FR4 тяжелой цепи.

ВСМА-специфические связывающие домены, предусмотренные в данном документе, также содержат один, два, три, четыре, пять или шесть CDR. Такие CDR могут представлять собой CDR, не являющиеся человеческими, или измененные CDR, не являющиеся человеческими, выбранные из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления ВСМА-специфический связывающий домен содержит (а) переменную область легкой цепи, которая содержит CDRL1 легкой цепи, CDRL2 легкой цепи и CDRL3 легкой цепи, а также (b) переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDRH1 тяжелой цепи, CDRH2 тяжелой цепи и CDRH3 тяжелой цепи.

2. Линкеры

В определенных вариантах осуществления CAR, рассмотренные в данном документе, могут содержать линкерные остатки между различными доменами, например, добавленные для соответствующего разделения их в пространстве и обеспечения конформации молекулы. В конкретных вариантах осуществления линкер представляет собой последовательность, связывающую переменные области. «Последовательность, связывающая переменные области» представляет собой аминокислотную последовательность, которая соединяет V_H и V_L и обеспечивает спейсерную функцию, совместимую с взаимодействием двух связывающих субдоменов, так что полученный полипептид сохраняет специфическую аффинность связывания с той же целевой молекулой, что и антитело, которое содержит такие же переменные области легкой и тяжелой цепей. CAR, рассмотренные в данном документе, могут содержать один, два, три, четыре или пять или более линкеров. В конкретных вариантах осуществления длина линкера составляет от приблизительно 1 до приблизительно 25 аминокислот, от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислот или от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, или любой другой промежуточный отрезок из аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот.

Иллюстративные примеры линкеров включают глициновые полимеры $(G)_n$; глицин-сериновые полимеры $(G_{1-5}S_{1-5})_n$, где n равняется целому числу, составляющему по меньшей мере один, два, три, четыре или пять; глицин-аланиновые полимеры; аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные из уровня техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить нейтральным связующим между доменами белков слияния, таких как CAR, описанные в данном документе. Глицин обеспечивает значительно большее фи-пси пространство, чем аланин, и является намного менее ограниченным, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Обычному специалисту в данной области будет понятно, что структура CAR в конкретных вариантах осуществления может включать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может содержать гибкий линкер, а также одну или более частей, обуславливающих менее

гибкую структуру с обеспечением необходимой структуры CAR.

Другие примеры линкеров включают без ограничений следующие аминокислотные последовательности: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 46); TGEKP (SEQ ID NO: 47) (см., например, Liu et al., PNAS 5525-5530 (1997)); GRR (SEQ ID NO: 48) (Pomerantz et al. 1995, выше); (GGGGS)_n где n = 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 49) (Kim et al., PNAS 93, 1156-1160 (1996.); EGKSSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 50) (Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 51) (Bird et al., 1988, Science 242:423-426), GRRGGGS (SEQ ID NO: 52); LRQDGERP (SEQ ID NO: 53); LRQKGGGSERP (SEQ ID NO: 54); LRQKd(GGGGS)₂ ERP (SEQ ID NO: 55). В качестве альтернативы гибкие линкеры могут быть разработаны методами рационального дизайна с использованием компьютерной программы, способной моделировать как связывающие сайты в виде ДНК, так и пептиды сами по себе (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994), или с помощью методов фагового дисплея. В одном варианте осуществления линкер содержит следующую аминокислотную последовательность: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 56) (Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

3. Спейсерный домен

В конкретных вариантах осуществления за связывающим доменом CAR следует один или более «спейсерных доменов», которыми называют область, отодвигающую антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего контакта клетка/клетка, связывания антигена и активации (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В определенных вариантах осуществления спейсерный домен представляет собой часть иммуноглобулина, включающую без ограничения одну или более константных областей тяжелой цепи, например, CH2 и CH3. Спейсерный домен может включать аминокислотную последовательность из встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

В одном варианте осуществления спейсерный домен содержит CH2- и CH3-домены из IgG1 или IgG4.

4. Шарнирный домен

За связывающим доменом CAR, как правило, следует один или более «шарнирных доменов», которые играют роль в регуляции положения антигенсвязывающего домена, отодвигая его от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего контакта клетка/клетка, связывания антигена и активации. CAR, как правило, содержит один или более шарнирных доменов между связывающим доменом и трансмембранным (ТМ) доменом. Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный домен может включать аминокислотную последовательность из встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

Термин «измененная шарнирная область» относится к (а) встречающейся в природе шарнирной области, которая содержит не более 30% аминокислотных изменений (например, до 25%, 20%, 15%, 10% или 5% аминокислотных замен или делеций), (b) части встречающейся в природе шарнирной области, длина которой составляет по меньшей мере 10 аминокислот (например, по меньшей мере 12, 13, 14 или 15 аминокислот), при этом она содержит не более 30% аминокислотных изменений (например, до 25%, 20%, 15%, 10% или 5% аминокислотных замен или делеций), или (с) части встречающейся в природе шарнирной области, которая содержит коровую

шарнирную область (длина которой составляет 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, или по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот). В определенных вариантах осуществления один или более цистеиновых остатков во встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина могут быть замещены на один или более других аминокислотных остатков (например, один или более сериновых остатков). Измененная шарнирная область иммуноглобулина может альтернативно или дополнительно характеризоваться тем, что пролиновый остаток из шарнирной области иммуноглобулина дикого типа замещен другим аминокислотным остатком (например, сериновым остатком).

Другие иллюстративные шарнирные домены, пригодные для применения в CAR, описанных в данном документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков 1 типа, таких как CD8 α , CD4, CD28, PD1, CD152 и CD7, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть измененными. В другом варианте осуществления шарнирный домен содержит шарнирную область PD1, CD152 или CD8 α .

5. Трансмембранный (ТМ) домен

«Трансмембранный домен» представляет собой часть CAR, которая объединяет внеклеточную связывающую часть и внутриклеточный домен передачи сигнала, а также заякоривает CAR в плазматической мембране иммунной эффекторной клетки. ТМ-домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. ТМ-домен может быть получен из (т. е. содержит по меньшей мере трансмембранную область(-и)) альфа-, бета- или зета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1. В конкретном варианте осуществления ТМ-домен является синтетическим и преимущественно содержит гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

В одном варианте осуществления CAR, рассмотренный в данном документе, содержит ТМ-домен, полученный из PD1, CD152 или CD8 α . В другом варианте осуществления CAR, рассмотренный в данном документе, содержит ТМ-домен, полученный из PD1, CD152 или CD8 α , и короткий олиго- или полипептидный линкер длиной предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, который связывает ТМ-домен и внутриклеточный домен передачи сигнала у CAR. Линкер на основе глицина-серина является особенно подходящим линкером.

6. Внутриклеточный домен передачи сигнала

В конкретных вариантах осуществления CAR, рассмотренные в данном документе, содержат внутриклеточный домен передачи сигнала. «Внутриклеточным доменом передачи сигнала» называют часть CAR, которая участвует в передаче сообщения об эффективном связывании CAR к ВСМА с полипептидом человеческого ВСМА во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки для запуска эффекторной функции клетки, например, активации, выработки цитокинов, пролиферации и цитотоксической активности, в том числе высвобождения цитотоксических факторов в CAR-связанную целевую клетку, или других клеточных ответов, вызываемых связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR.

Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции иммунной эффекторной клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включающую секрецию цитокина. Таким образом, термин «внутриклеточный домен передачи сигнала» относится к части белка, которая передает сигнал для запуска эффекторной функции и которая

обуславливает выполнение клеткой специализированной функции. Несмотря на то, что обычно можно использовать целый внутриклеточный домен передачи сигнала, во многих случаях отсутствует необходимость применения целого домена. В тех случаях, когда применяют усеченную часть внутриклеточного домена передачи сигнала, такую усеченную часть можно применять вместо целого домена, при условии что он передает сигнал для запуска эффекторной функции. Термин внутриклеточный домен передачи сигнала подразумевает, что он включает любую усеченную часть внутриклеточного домена передачи сигнала, достаточную для передачи сигнала для запуска эффекторной функции.

Известно, что сигналы, генерируемые посредством только TCR, являются недостаточными для полной активации Т-клетки, и что также требуется вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клетки опосредуется двумя различными классами внутриклеточных доменов передачи сигнала: доменами передачи первичного сигнала, которые инициируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (например, комплекса TCR/CD3), и доменами передачи костимулирующего сигнала, которые действуют независимым от антигена образом с обеспечением вторичного или костимулирующего сигнала. В предпочтительных вариантах осуществления CAR, рассмотренный в данном документе, содержит внутриклеточный домен передачи сигнала, который включает один или более «доменов передачи костимулирующего сигнала» и «домен передачи первичного сигнала».

Домены передачи первичного сигнала реагируют на первичную активацию комплекса TCR либо по пути стимуляции, либо по пути ингибирования. Домены передачи первичного сигнала, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать мотивы передачи сигнала, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM.

Иллюстративные примеры ITAM-содержащих доменов передачи первичного сигнала, которые являются особенно применимыми в настоящем изобретении, включают таковые, полученные из TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления CAR содержит домен передачи первичного сигнала CD3 ζ и один или более доменов передачи костимулирующего сигнала. Внутриклеточные домены передачи первичного сигнала и передачи костимулирующего сигнала могут быть присоединены в любом порядке последовательно к карбоксильному концу трансмембранного домена.

CAR, рассмотренные в данном документе, содержат один или более доменов передачи костимулирующего сигнала для повышения эффективности и размножения Т-клеток, экспрессирующих CAR-рецепторы. Используемый в данном документе термин «домен передачи костимулирующего сигнала» или «домен костимуляции» относится к внутриклеточному домену передачи сигнала костимулирующей молекулы.

Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, не являющиеся антигенными рецепторами и Fc-рецепторами, которые обеспечивают вторичный сигнал, требуемый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов после связывания с антигеном. Иллюстративные примеры таких костимулирующих молекул включают CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70. В одном варианте осуществления CAR содержит один или более доменов передачи костимулирующего сигнала, выбранных из группы,

включающей CD28, CD137 и CD134, а также домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В другом варианте осуществления CAR содержит домены передачи костимулирующего сигнала CD28 и CD137, а также домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

5 В еще одном варианте осуществления CAR содержит домены передачи костимулирующего сигнала CD28 и CD134, а также домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В одном варианте осуществления CAR содержит домены передачи костимулирующего сигнала CD137 и CD134, а также домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

10 В одном варианте осуществления CAR содержит домен передачи костимулирующего сигнала CD137, а также домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В одном варианте осуществления CAR содержит домен передачи костимулирующего сигнала CD134, а также домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

15 В одном варианте осуществления CAR содержит домен передачи костимулирующего сигнала CD28, а также домен передачи первичного сигнала CD3 ζ .

В конкретных вариантах осуществления CAR, рассмотренные в данном документе, содержат гуманизированное антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с полипептидом BCMA, экспрессируемым на В-клетках.

20 В одном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к BCMA, который связывает полипептид BCMA, трансмембранный домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, включающей: альфа-, бета- или зета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 и PD1; и один или
25 более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, включающей: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и домен передачи
30 первичного сигнала из TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В одном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к BCMA, который связывает полипептид BCMA; шарнирный домен, выбранный из группы, включающей: шарнир/CH2/CH3 IgG1, шарнир/CH2/CH3 IgG4, шарнир PD1, шарнир
35 CD152, шарнир CD8 α ; трансмембранный домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, включающей: альфа-, бета- или зета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 и PD1; и один или более
40 внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, включающей: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и домен передачи первичного сигнала из TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

45 В одном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к BCMA, который связывает полипептид BCMA; шарнирный домен, выбранный из группы, включающей: шарнир/CH2/CH3 IgG1, шарнир/CH2/CH3 IgG4, шарнир PD1, шарнир CD152, шарнир CD8 α ; трансмембранный домен, полученный из полипептида,

выбранного из группы, включающей: альфа-, бета- или зета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 и PD1; короткий олиго- или полипептидный линкер длиной предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, который связывает ТМ-домен с внутриклеточным доменом передачи сигнала CAR; и один или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, включающей: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и домен передачи первичного сигнала из TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к ВСМА, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен, содержащий полипептид шарнира/CH2/CH3 IgG1 и полипептид CD8α; трансмембранный домен CD8α, содержащий полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный домен передачи костимулирующего сигнала CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3ζ.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к ВСМА, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8α; трансмембранный домен CD8α, содержащий полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный домен передачи костимулирующего сигнала CD134 и домен передачи первичного сигнала CD3ζ.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к ВСМА, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8α; трансмембранный домен CD8α, содержащий полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный домен передачи костимулирующего сигнала CD28 и домен передачи первичного сигнала CD3ζ.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к ВСМА, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен, содержащий полипептид шарнира PD1; трансмембранный домен PD1 или CD152, содержащий полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный домен передачи костимулирующего сигнала CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3ζ.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к ВСМА, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен, содержащий полипептид шарнира PD1; трансмембранный домен PD1 или CD152, содержащий полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный домен передачи костимулирующего сигнала CD134 и домен передачи первичного сигнала CD3ζ.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к ВСМА, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен, содержащий полипептид шарнира PD1; трансмембранный домен PD1 или CD152, содержащий полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный домен передачи костимулирующего сигнала CD28 и домен передачи первичного сигнала CD3ζ.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к ВСМА, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен, содержащий полипептид шарнира CD152; трансмембранный домен PD1 или CD152, содержащий полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; 5 внутриклеточный домен передачи костимулирующего сигнала CD137 и домен передачи первичного сигнала CD3ζ.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к ВСМА, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен, содержащий полипептид шарнира CD152; трансмембранный домен PD1 или CD152, содержащий 10 полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный домен передачи костимулирующего сигнала CD134 и домен передачи первичного сигнала CD3ζ.

В конкретном варианте осуществления CAR содержит гуманизированный scFv к ВСМА, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен, содержащий 15 полипептид шарнира CD152; трансмембранный домен PD1 или CD152, содержащий полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный домен передачи костимулирующего сигнала CD28 и домен передачи первичного сигнала CD3ζ.

Кроме того, структура CAR, рассмотренных в данном документе, позволяет улучшить 20 размножение, долгосрочную персистенцию и цитотоксические свойства Т-клеток, экспрессирующих CAR, по сравнению с немодифицированными Т-клетками или Т-клетками, модифицированными для экспрессии других CAR.

D. Полипептиды

В настоящем изобретении рассмотрены, в частности, полипептиды CAR или их 25 фрагменты, клетки и композиции, содержащие таковые, а также векторы, которые экспрессируют полипептиды. В предпочтительных вариантах осуществления предусмотрен полипептид, содержащий один или более CAR, изложенных под любым из SEQ ID NO: 15-29, 71 и 73.

«Полипептид», «фрагмент полипептида», «пептид» и «белок» используются 30 взаимозаменяемо, если не указано обратное, и в соответствии с общепринятым значением, т. е. последовательность из аминокислот. Полипептиды не ограничены определенной длиной, например, они могут содержать последовательность белка полной длины или фрагмент белка полной длины, и могут включать посттрансляционные модификации полипептида, например, гликозилирования, 35 ацетилирования, фосфорилирования и т. п., а также другие модификации, известные из уровня техники, как встречающиеся, так и не встречающиеся в природе. В различных вариантах осуществления полипептиды CAR, рассмотренные в данном документе, содержат сигнальную (или лидерную) последовательность на N-терминальном конце белка, которая котрансляционно или посттрансляционно управляет переносом белка. 40 Иллюстративные примеры подходящих сигнальных последовательностей, применимых в CAR, раскрытых в данном документе, включают без ограничения сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальный полипептид CD8α или сигнальный полипептид альфа-субъединицы рецептора GM-CSF человека. Полипептиды могут быть получены с помощью любой из множества хорошо известных методик рекомбинации 45 и/или синтеза. Полипептиды, рассмотренные в данном документе, в частности, охватывают CAR по настоящему раскрытию или последовательности, которые имеют делеции, добавления, и/или замены одной или более аминокислот относительно CAR, раскрытого в данном документе.

«Выделенный пептид» или «выделенный полипептид» и т. п., используемые в данном документе, относятся к *in vitro* выделению и/или очистке пептидной или полипептидной молекулы из клеточного окружения, а также от связи с другими компонентами клетки, т. е. она в значительной степени не находится в ассоциации с веществами, с которыми
 5 связана *in vivo*. Аналогично термин «выделенная клетка» относится к клетке, которая была получена из *in vivo* ткани или органа и практически не содержит внеклеточный матрикс.

Полипептиды включают «варианты полипептида». Варианты полипептида могут отличаться от встречающегося в природе полипептида одной или более заменами, делециями, добавлениями и/или вставками. Такие варианты могут быть встречающимися в природе или могут быть получены синтетическим путем, например, посредством модификации одной или более упомянутых выше полипептидных последовательностей. Например, в конкретных вариантах осуществления может быть необходимо улучшить
 10 аффинность связывания и/или другие биологические свойства CAR посредством введения одной или более замен, делеций, добавлений и/или вставок в связывающий домен, шарнир, ТМ-домен, домен передачи костимулирующего сигнала или домен передачи первичного сигнала полипептида CAR. Предпочтительно полипептиды по настоящему изобретению предусматривают полипептиды, характеризующиеся по меньшей мере приблизительно 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% аминокислотной
 15 идентичностью с ними.

Полипептиды включают «фрагменты полипептида». Фрагментами полипептида называют полипептид, который может быть мономерным или мультимерным, характеризующийся делецией на amino-конце, делецией на карбокси-конце и/или внутренней делецией или заменой относительно встречающегося в природе или
 25 полученного рекомбинантным способом полипептида. В определенных вариантах осуществления фрагмент полипептида может содержать аминокислотную цепь, имеющую длину по меньшей мере от 5 до приблизительно 500 аминокислот. Следует иметь в виду, что в определенных вариантах осуществления фрагменты имеют длину по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,
 30 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Особенно применимые фрагменты полипептида включают функциональные домены, в том числе антигенсвязывающие домены или фрагменты антител. В случае гуманизированного антитела к BCMA, применимые фрагменты включают без
 35 ограничения: CDR-участок, CDR3-участок тяжелой или легкой цепи; вариабельную область тяжелой или легкой цепи; часть цепи антитела или вариабельной области, в том числе два CDR, и т. п.

Полипептид также может быть слит в рамке считывания или конъюгирован с линкерной или другой последовательностью для облегчения синтеза, очистки или
 40 идентификации полипептида (например, поли-His) или для улучшения связывания полипептида с твердым носителем.

Как уже отмечалось выше, полипептиды по настоящему изобретению могут быть изменены различными методами, в том числе иметь аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки. Способы таких манипуляций общеизвестны из уровня техники. Например, варианты аминокислотной последовательности эталонного полипептида
 45 могут быть получены посредством введения мутаций в ДНК. Способы мутагенеза и изменений нуклеотидной последовательности хорошо известны из уровня техники. См., например, Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 488-492), Kunkel et al., (1987,

Methods in Enzymol, 154: 367-382), патент США № 4873192, Watson, J. D. et al., (Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) и ссылочные документы, процитированные в них. Рекомендации, касающиеся подходящих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес белка, можно найти в модели Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

В определенных вариантах осуществления вариант будет содержать консервативные замены. «Консервативной заменой» является та, при которой аминокислота замещена на другую аминокислоту, которая характеризуется аналогичными свойствами, вследствие чего специалист в области техники, связанной с химией пептидов, может ожидать, что вторичная структура и гидропатичная природа полипептида практически не изменятся. В структуре полинуклеотидов и полипептидов по настоящему изобретению можно выполнять модификации и, тем не менее, получать функциональную молекулу, которая кодирует вариантный или производный полипептид с необходимыми характеристиками. Когда необходимо изменить аминокислотную последовательность полипептида для создания эквивалентного или даже улучшенного вариантного полипептида по настоящему изобретению, специалист в данной области, например, может изменить один или более кодонов кодирующей ДНК-последовательности, например, в соответствии с таблицей 1.

ТАБЛИЦА 1. Кодоны, кодирующие аминокислоты

Аминокислоты	Однобуквенный код	Трехбуквенный код	Кодоны			
Аланин	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU
Цистеин	C	Cys	UGC	UGU		
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GAC	GAU		
Глутаминовая кислота	E	Glu	GAA	GAG		
Фенилаланин	F	Phe	UUC	UUU		
Глицин	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU
Гистидин	H	His	CAC	CAU		
Изолейцин	I	Iso	AUA	AUC	AUU	
Лизин	K	Lys	AAA	AAG		
Лейцин	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC
Метионин	M	Met	AUG			
Аспарагин	N	Asn	AAC	AAU		
Пролин	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU
Глутамин	Q	Gln	CAA	CAG		
Аргинин	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC
Серин	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC
Треонин	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU

Валин	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU
Триптофан	W	Tyr	UGG			
Тирозин	Y	Tyr	UAC	UAU		

Рекомендации по определению того, какие аминокислотные остатки можно заменить, вставить или удалить без потери биологической активности, можно найти с использованием компьютерных программ, хорошо известных из уровня техники, таких как программное обеспечение DNASTARTM. Предпочтительно аминокислотные изменения в вариантах белка, раскрытых в данном документе, представляют собой консервативные аминокислотные изменения, т. е. замены на аналогично заряженные или незаряженные аминокислоты. Консервативное аминокислотное изменение предусматривает замену в пределах одного семейства аминокислот, которые имеют сходные боковые цепи. Встречающиеся в природе аминокислоты, как правило, подразделяют на четыре семейства: кислотные (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют совместно как ароматические аминокислоты. Подходящие консервативные замены аминокислот в пептиде или белке известны специалистам в данной области и, как правило, их можно выполнять без изменения биологической активности полученной молекулы. Специалистам в данной области будет понятно, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида практически не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224). Примеры консервативных замен описаны в предварительной заявке на патент США № 61/241647, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

При выполнении таких изменений можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Важность индекса гидропатичности аминокислот в обеспечении согласованной биологической функции белка в целом известна из уровня техники (Kyte and Doolittle, 1982, включена в данный документ посредством ссылки). Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основании ее гидрофобности и характеристик заряда (Kyte and Doolittle, 1982). Эти значения являются следующими: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистеин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

Из уровня техники известно, что определенные аминокислоты можно замещать на другие аминокислоты с аналогичным индексом или показателем гидропатичности и, тем не менее, получать белок с аналогичной биологической активностью, т. е., тем не менее, получать белок, эквивалентный по биологической функции. При выполнении таких изменений замена аминокислот, индексы гидропатичности которых находятся в пределах ± 2 , является предпочтительной, находятся в пределах ± 1 , является особенно предпочтительной, и находятся в пределах $\pm 0,5$, является еще более предпочтительной. Также из уровня техники известно, что замену подобных аминокислот можно эффективно выполнять на основании гидрофильности.

Как подробно изложено в патенте США № 4554101, аминокислотным остаткам

были присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0 ± 1); глутамат (+3,0 ± 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (−0,4); пролин (−0,5 ± 1); аланин (−0,5); гистидин (−0,5); цистеин (−1,0); метионин (−1,3); валин (−1,5); лейцин (−1,8); изолейцин (−1,8); тирозин (−2,3); фенилаланин (−2,5); триптофан (−3,4). Следует понимать, что аминокислоту можно заменить другой аминокислотой, характеризующейся аналогичным значением гидрофильности и, тем не менее, получать биологически эквивалентный и, в частности, иммунологически эквивалентный белок. При таких изменениях замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ±2, является предпочтительной, находятся в пределах ±1, является особенно предпочтительной, и находятся в пределах ±0,5, является еще более предпочтительной.

Как было обозначено выше, аминокислотные замены могут быть основаны на относительном сходстве заместителей в боковой цепи аминокислот, например, сходстве их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и т. п.

Варианты полипептида дополнительно включают гликозилированные формы, конъюгаты, образованные путем агрегации с другими молекулами, а также конъюгаты с образованием ковалентной связи с неродственными химическими фрагментами (например, пегилированные молекулы). Варианты с ковалентной связью можно получать путем связывания функциональных групп с группами, которые находятся в аминокислотной цепи, или с N- или C-концевым остатком, как известно из уровня техники. Варианты также включают аллельные варианты, видовые варианты и мутеины. Усечения или делеции областей, которые не влияют на функциональную активность белков, также приводят к образованию вариантов.

В одном варианте осуществления, в котором необходима экспрессия двух или более полипептидов, полинуклеотидные последовательности, кодирующие их, можно разделять с помощью последовательности IRES, как обсуждается в других частях данного документа. В другом варианте осуществления два или более полипептидов могут экспрессироваться в виде белка слияния, который содержит одну или более саморасщепляющихся полипептидных последовательностей.

Полипептиды по настоящему изобретению включают слитые полипептиды. В предпочтительных вариантах осуществления предусмотрены слитые полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие слитые полипептиды, например, CAR. Слитыми полипептидами и белками слияния называют полипептид, который имеет по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять, или большее количество полипептидных сегментов. Слитые полипептиды, как правило, присоединены С-концом к N-концу, хотя они также могут быть присоединены С-концом к С-концу, N-концом к N-концу или N-концом к С-концу. Полипептиды в белке слияния могут находиться в любом порядке или в определенном порядке. Слитые полипептиды или белки слияния могут также включать консервативно модифицированные варианты, полиморфные варианты, аллели, мутанты, подпоследовательности и межвидовые гомологи, при условии сохранения необходимой транскрипционной активности слитого полипептида. Слитые полипептиды можно получать с помощью способов химического синтеза, или с помощью химического связывания двух фрагментов, или, как правило, можно получать с помощью других стандартных методик. Лигированные последовательности ДНК, кодирующие слитый полипептид, функционально связаны с подходящими элементами контроля транскрипции или трансляции, как обсуждается в других частях данного документа.

В одном варианте осуществления партнер по слиянию предусматривает

последовательность, которая способствует экспрессии белка (энхансер экспрессии), приводя к более высоким выходам по сравнению с нативным рекомбинантным белком. Другие партнеры по слиянию могут быть выбраны таким образом, чтобы увеличить растворимость белка, или чтобы обеспечить возможность направления белка в
 5 необходимые внутриклеточные компартменты, или чтобы облегчить транспорт белка слияния через клеточную мембрану.

Слитые полипептиды могут дополнительно содержать сигнал расщепления полипептида между каждым из полипептидных доменов, описанных в данном документе. Кроме того, сайт расщепления полипептида может быть помещен в последовательность
 10 любого линкерного пептида. Примеры сигналов расщепления полипептида включают сайты распознавания для расщепления полипептида, такие как сайты расщепления для протеазы, сайты расщепления для нуклеазы (например, сайты распознавания для редкощепляющего фермента, сайты распознавания для саморасщепляющихся рибозимов) и саморасщепляющиеся вирусные олигопептиды (см. deFelipe and Ryan, 2004. Traffic, 5
 15 (8); 616-26).

Подходящие сайты расщепления для протеазы и саморасщепляющиеся пептиды хорошо известны специалисту в данной области (см., например, в Ryan et al., 1997. J. Gener. Virol. 78, 699-722; Scymczak et al. (2004) Nature Biotech. 5, 589-594). Примеры сайтов расщепления для протеазы включают без ограничения сайты расщепления для N1a-
 20 протеаз потивируса (например, протеаза вируса гравировки табака), HC-протеаз потивируса, P1 (P35)-протеаз потивируса, N1a-протеаз бимовируса, RNA-2-кодируемых протеаз бимовируса, L-протеаз афтоввируса, 2A-протеаз энтеровируса, 2A-протеаз риновируса, 3C-протеаз пикорнавируса, 24K-протеаз комовируса, 24K-протеаз неповируса, 3C-подобной протеазы RTSV (сферический вирус тунгро риса), 3C-подобной
 25 протеазы PYVF (вирус желтой пятнистости пастернака), гепарина, тромбина, фактора Ха и энтерокиназы. В одном варианте осуществления в силу высокой точности их расщепления предпочтительными являются сайты расщепления для протеазы TEV (вирус гравировки табака), например, EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 57), например, ENLYFQG (SEQ ID NO: 58) и ENLYFQS (SEQ ID NO: 59), где X представляет собой
 30 любую аминокислоту (расщепление посредством TEV происходит между Q и G или Q и S).

В конкретном варианте осуществления саморасщепляющиеся пептиды предусматривают полипептидные последовательности, полученные из 2A-пептидов потивируса и кардиовируса, FMDV (вируса ящура), вируса ринита лошадей типа А,
 35 вируса Thosea asigna и тешовируса свиней.

В определенных вариантах осуществления сайт саморасщепляющегося полипептида предусматривает сайт, последовательность или домен из 2A-пептида или 2A-подобного пептида (Donnelly et al., 2001. J. Gen. Virol. 82:1027-1041).

ТАБЛИЦА 2. Примеры сайтов из 2A-пептидов включают следующие
 40 последовательности

SEQ ID NO: 60	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 61	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 62	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 63	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 64	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 65	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 66	VTELLYRMKRAETYCPRPLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO: 67	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 68	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 69	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

В предпочтительных вариантах осуществления полипептид, рассмотренный в данном документе, представляет собой полипептид CAR.

Е. Полинуклеотиды

В предпочтительных вариантах осуществления предусмотрен полинуклеотид, кодирующий один или более полипептидов CAR, например, под SEQ ID NO: 30-44, 70 и 72. Используемые в данном документе термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относятся к матричной РНК (мРНК), РНК, геномной РНК (gRNA), плюс-нити РНК (РНК(+)), минус-нити РНК (РНК(-)), геномной ДНК (gDNA), комплементарной ДНК (кДНК) или рекомбинантной ДНК. Полинуклеотиды включают одно- и двухнитевые полинуклеотиды. Предпочтительно полинуклеотиды по настоящему изобретению предусматривают полинуклеотиды или варианты, характеризующиеся по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с любой из эталонных последовательностей, описанных в данном документе (см., например, Перечень последовательностей), при этом, как правило, вариант сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность эталонной последовательности. В различных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены, в частности, полинуклеотиды, включающие векторы экспрессии, вирусные векторы и плазмиды-переносчики, а также композиции и клетки, содержащие их.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены полинуклеотиды, которые кодируют по меньшей мере приблизительно 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 или 2000 или более смежных аминокислотных остатков полипептида по настоящему изобретению, а также все полипептиды промежуточной длины. Нетрудно понять, что «промежуточной длины» в данном контексте означает любую длину между приведенными значениями, например, 6, 7, 8, 9 и т. д., 101, 102, 103 и т. д.; 151, 152, 153 и т. д.; 201, 202, 203 и т. д.

Используемые в данном документе термины «вариант полинуклеотида» и «вариант» и т. п. относятся к полинуклеотидам, проявляющим существенную идентичность последовательности с эталонной полинуклеотидной последовательностью, или к полинуклеотидам, которые гибридизуются с эталонной последовательностью в жестких условиях, которые определены ниже в данном документе. Данные термины включают полинуклеотиды, в которых один или более нуклеотидов были добавлены или удалены, или замещены другими нуклеотидами по сравнению с эталонным полинуклеотидом.

При этом из уровня техники хорошо известно, что определенные изменения, в том числе мутации, добавления, делеции и замены, можно выполнять относительно эталонного полинуклеотида, при условии что измененный полинуклеотид сохраняет биологическую функцию или активность эталонного полинуклеотида.

- 5 Перечисления «идентичности последовательности» или содержащие, например, «последовательность на 50% идентична», используемые в данном документе, относятся к степени, с которой данные последовательности являются идентичными при попарном сравнении нуклеотидов или попарном сравнении аминокислот в окне сравнения. Таким образом, «процентное значение идентичности последовательности» можно рассчитать
- 10 путем сравнения двух последовательностей, подвергнутых оптимальному выравниванию в окне сравнения, определения числа положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты (например, A, T, C, G, I) или идентичный аминокислотный остаток (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) встречаются в обеих последовательностях, чтобы получить число
- 15 совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (т. е. размер окна) и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей. Предусмотрены нуклеотиды и полипептиды, характеризующиеся по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%
- 20 идентичностью последовательности с любой из эталонных последовательностей, описанных в данном документе, как правило, при условии, что вариант полипептида сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность эталонного полипептида.

- Термины, используемые для описания взаимосвязи последовательностей двух или более полинуклеотидов или полипептидов, включают следующие: «эталонная
- 25 последовательность», «окно сравнения», «идентичность последовательности», «процентное значение идентичности последовательности» и «существенная идентичность». Длина «эталонной последовательности» составляет по меньшей мере 12, но чаще 15-18 и зачастую по меньшей мере 25 мономерных единиц, в том числе нуклеотидов и аминокислотных остатков. Поскольку каждый из двух полинуклеотидов
- 30 может содержать (1) последовательность (т. е. только часть полной полинуклеотидной последовательности), которая сходна у двух полинуклеотидов, и (2) последовательность, которая отлична у двух полинуклеотидов, сравнения последовательностей двух (или более) полинуклеотидов, как правило, выполняют путем сравнения последовательностей двух полинуклеотидов в «окне сравнения» для выявления и сравнения локальных
- 35 областей сходства последовательностей. «Окно сравнения» относится к умозрительному сегменту по меньшей мере из 6 смежных положений, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 100, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность сравнивают с эталонной последовательностью из того же количества смежных положений после того, как две последовательности подвергли
- 40 оптимальному выравниванию. Окно сравнения может содержать приблизительно 20% или меньше добавлений или делеций (т. е. гэпов) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания в окне сравнения можно проводить с помощью
- 45 компьютеризированной реализации алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics версия 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин, США) или посредством просмотра наилучшего выравнивания (т. е. приводящего к наиболее высокому процентному значению

гомологии в окне сравнения), полученному с помощью любого из различных выбранных способов. Также можно упомянуть семейство программ BLAST, например, раскрытое в Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Подробное обсуждение анализа последовательностей можно найти в разделе 19.3 в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15.

Используемый в данном документе «выделенный полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, который был очищен от последовательностей, которые фланкируют его во встречающемся в природе состоянии, например, к ДНК-фрагменту, который был освобожден от последовательностей, которые в норме расположены рядом с данным фрагментом. «Выделенный полинуклеотид» относится также к комплементарной ДНК (кДНК), рекомбинантной ДНК или другому полинуклеотиду, который не существует в природе и который был создан руками человека.

Термины, описывающие ориентацию полинуклеотидов, включают: 5' (в норме конец полинуклеотида со свободной фосфатной группой) и 3' (в норме конец полинуклеотида со свободной гидроксильной (ОН) группой). Полинуклеотидные последовательности могут быть аннотированы в ориентации 5'-3' или в ориентации 3'-5'. В случае ДНК и мРНК нить 5'-3' обозначают как «смысловую», «плюс» или «кодирующую» нить, поскольку ее последовательность идентична последовательности предшественника матричной РНК (пре-мРНК) [за исключением урацила (U) в РНК, вместо тимина (Т) в ДНК]. В случае ДНК и мРНК комплементарную нить 3'-5', которая представляет собой нить, транскрибируемую РНК-полимеразой, обозначают как «шаблон», «антисмысловая», «минус» или «некодирующая» цепь. Используемый в данном документе термин «обратная ориентация» относится к последовательности 5'-3', записанной в ориентации 3'-5', или к последовательности 3'-5', записанной в ориентации 5'-3'.

Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к полинуклеотидам (т. е. последовательности из нуклеотидов), состоящим во взаимосвязи по правилам спаривания оснований. Например, комплементарная нить для последовательности ДНК 5' A G T C A T G 3' представляет собой 3' T C A G T A C 5'. Последнюю последовательность часто записывают в виде обратно комплементарной с 5'-концом слева и 3'-концом справа 5' C A T G A C T 3'. Последовательность, которая эквивалентна своей обратно комплементарной последовательности, считается палиндромной последовательностью. Комплементарность может быть «частичной», при этом только некоторые основания нуклеиновой кислоты совпадают в соответствии с правилами спаривания оснований. Или же между нуклеиновыми кислотами может быть «полная» или «тотальная» комплементарность.

Более того, специалистам в данной области будет понятно, что вследствие вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептид, или его фрагмент, или вариант, как описано в данном документе. Некоторые из этих полинуклеотидов характеризуются минимальной гомологией с нуклеотидной последовательностью какого бы то ни было нативного гена. Тем не менее, полинуклеотиды, которые отличаются вследствие различий в частоте использования кодонов особым образом предусмотрены в настоящем изобретении, например, полинуклеотиды, которые оптимизированы путем выбора кодонов, подходящих для человека и/или приматов. Кроме того, также могут использоваться аллели генов, содержащих полинуклеотидные последовательности, предусмотренные в данном документе. Аллели представляют собой эндогенные гены, которые изменены в результате одной или более мутаций, таких как делеции, добавления

и/или замены нуклеотидов.

Термин «кассета нуклеиновой кислоты», используемый в данном документе, относится к генетическим последовательностям в пределах вектора, которые могут экспрессировать РНК, а затем белок. Кассета нуклеиновой кислоты содержит ген, представляющий интерес, например, CAR. Кассета нуклеиновой кислоты ориентирована в пределах вектора с точки зрения положения и последовательного размещения таким образом, что нуклеиновая кислота в кассете может транскрибироваться в РНК и, при необходимости, транслироваться в белок или полипептид, который подвергается соответствующим посттрансляционным модификациям, необходимым для активности в трансформированной клетке, и также перемещается в соответствующий компартмент для биологической активности путем направления в соответствующие внутриклеточные компартменты или секреты во внеклеточные компартменты. Предпочтительно 3'- и 5'-концы кассеты приспособлены для беспрепятственной вставки в вектор, например, она содержит сайты для рестрикционной эндонуклеазы на каждом конце. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения кассета нуклеиновой кислоты содержит последовательность химерного антигенного рецептора, применимого для лечения В-клеточного злокачественного новообразования. Кассета может быть удалена и вставлена в плазмидный или вирусный вектор в виде отдельной единицы.

В конкретных вариантах осуществления полинуклеотиды предусматривают по меньшей мере один полинуклеотид, представляющий интерес. Используемый в данном документе термин «полинуклеотид, представляющий интерес» относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид (т. е. полипептид, представляющий интерес), вставленному в вектор экспрессии, экспрессию которого требуется осуществить. Вектор может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 полинуклеотидов, представляющих интерес. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, представляющий интерес, кодирует полипептид, который обеспечивает терапевтический эффект при лечении или предупреждении заболевания или нарушения. Полинуклеотиды, представляющие интерес, а также полипептиды, кодируемые ими, включают как полинуклеотиды, которые кодируют полипептиды дикого типа, так и их функциональные варианты и фрагменты. В конкретных вариантах осуществления функциональный вариант характеризуется по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью с соответствующей эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательностью дикого типа. В определенных вариантах осуществления функциональный вариант или фрагмент характеризуются по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% биологической активностью относительно соответствующего полипептида дикого типа.

В одном варианте осуществления полинуклеотид, представляющий интерес, не кодирует полипептид, но служит в качестве шаблона для транскрипции miRNA, siRNA или shRNA, рибозима или других ингибиторных РНК. В различных других вариантах осуществления полинуклеотид содержит полинуклеотид, представляющий интерес, кодирующий CAR, и один или более дополнительных полинуклеотидов, представляющих интерес, в том числе без ограничения последовательность ингибиторной нуклеиновой кислоты, в том числе без ограничения: siRNA, miRNA, shRNA и рибозим.

Используемые в данном документе термины «siRNA» или «короткая интерферирующая РНК» относятся к короткой полинуклеотидной последовательности, которая опосредует процесс специфичного в отношении последовательности

посттранскрипционного сайленсинга генов, ингибирования трансляции, ингибирования транскрипции или эпигентической RNAi у животных (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Fire et al., 1998, Nature, 391, 806; Hamilton et al., 1999, Science, 286, 950-951; Lin et al., 1999, Nature, 402, 128-129; Sharp, 1999, Genes & Dev., 13, 139-141; и Strauss, 1999, Science, 286, 886). В определенных вариантах осуществления siRNA содержит первую нить и вторую нить, которые имеют одинаковое число нуклеозидов; однако первая и вторая нити смещены так, что два концевых нуклеозида на первой и второй нитях не спарены с остатком на комплементарной нити. В некоторых случаях два таких неспаренных нуклеозида представляют собой остатки тимидина. siRNA должна включать область, обладающую достаточной степенью гомологии с целевым геном, и иметь достаточную длину в нуклеотидах, чтобы siRNA или ее фрагмент могли опосредовать отрицательную регуляцию целевого гена. Таким образом, siRNA включает область, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой РНК. Полная комплементарность между siRNA и мишенью не является обязательной, но соответствие между ними должно быть достаточным для обеспечения возможности того, чтобы siRNA или продукт ее расщепления управляли специфичным в отношении последовательности сайленсингом, например, путем RNAi-расщепления целевой РНК. Комплементарность или степень гомологии с целевой нитью является наиболее критическим параметром для антисмысловой нити. Несмотря на то, что зачастую необходима полная комплементарность, в частности антисмысловой нити, в некоторых вариантах осуществления предусмотрены одно или более, но предпочтительно 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 или меньше несовпадений относительно целевой РНК. Несовпадения наиболее допустимы в концевых областях, и, если присутствуют, они предпочтительно находятся в концевой области или областях, например, в пределах 6, 5, 4 или 3 нуклеотидов на 5'-и/или 3'-конце. Смысловая нить должна только быть в достаточной степени комплементарна антисмысловой нити для поддержания общей двухнитевой природы молекулы.

Кроме того, siRNA может быть модифицирована или включать аналоги нуклеозидов. Однонитевые области siRNA могут быть модифицированы или включать аналоги нуклеозидов, например, неспаренная область или области «шпильчатой» структуры, например, область, которая связывает две комплементарные области, может иметь модификации или аналоги нуклеозидов. Модификации также применимы для стабилизации одного или более 3'- или 5'-концов siRNA, например, защиты от действия экзонуклеаз, или для содействия введению антисмыслового siRNA-агента в RISC.

Модификации могут включать C3 (или C6, C7, C12) amino-линкеры, тиольные линкеры, карбоксильные линкеры, нуклеотидные спейсеры (C3, C6, C9, C12, с удаленными азотистыми основаниями, триэтиленгликоль, гексаэтиленгликоль), специальные биотиновые или флуоресцеиновые реагенты, которые являются фосфорамидитами, и которые характеризуются другой DMT-защищенной гидроксильной группой, что обеспечивает возможность множественного связывания в процессе синтеза РНК. Длина каждой нити siRNA может составлять 30, 25, 24, 23, 22, 21 или 20 нуклеотидов или меньше. Длина нити предпочтительно составляет по меньшей мере 19 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может составлять от 21 до 25 нуклеотидов. Предпочтительные siRNA имеют дуплексную область из 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов, и один или более «липких концов» из 2-3 нуклеотидов, предпочтительно один или два 3'-«липких конца» из 2-3 нуклеотидов.

Используемые в данном документе термины «miRNA» или «микроРНК» относятся к малым некодирующим РНК из 20–22 нуклеотидов, обычно вырезанным из ~70

нуклеотидных структур-предшественников на основе самогибридизирующейся РНК, известных как пре-miRNA. miRNA отрицательно регулируют свои мишени одним из двух способов в зависимости от степени комплементарности между miRNA и мишенью. Во-первых, miRNA, которая связывается с полной или практически полной

5 комплементарностью с последовательностями мРНК, кодирующими белок, индуцирует путь РНК-опосредованной интерференции (RNAi). miRNA, которые оказывают свой регуляторный эффект посредством связывания с не полностью комплементарными сайтами в пределах 3'-нетранслируемых областей (UTR) их мРНК-мишеней, подавляют экспрессию целевых генов пост-транскрипционно, по-видимому, на уровне трансляции, 10 посредством комплекса RISC, который схож или, возможно, идентичен тому, который используется в RNAi-пути. В подтверждение контроля трансляции miRNA, которые используют этот механизм, снижают уровни белка их целевых генов, но при этом уровни мРНК этих генов подвергаются лишь минимальному воздействию. miRNA охватывают как встречающиеся в природе miRNA, так и разработанные искусственно miRNA, 15 которые могут специфически нацеливаться на любую последовательность мРНК. Например, в одном варианте осуществления специалист в данной области может разработать короткие шпилечные РНК-конструкции, экспрессируемые в виде первичных транскриптов miRNA (например, miR-30 или miR-21) человека. В ходе такой разработки в шпилечную конструкцию добавляют сайт процессинга под действием Drosha и, как 20 было показано, значительно повышают эффективность нокдауна (Pusch et al., 2004). Стебель шпильки состоит из 22 нуклеотидов dsRNA (например, антисмысловой нити, которая характеризуется полной комплементарностью с требуемой мишенью) и 15-19-нуклеотидной петли из miR человека. Добавление miR-петли и miR30-фланкирующих последовательностей с одной или с обеих сторон шпильки приводит к более чем 10-кратному увеличению процессинга экспрессированных шпилек под действием Drosha 25 и Dicer, при сравнении с традиционными структурами shRNA без микроРНК. Увеличенный уровень процессинга под действием Drosha и Dicer обуславливает большую продукцию siRNA/miRNA и большую эффективность экспрессированных шпилек.

Используемые в данном документе термины «shRNA» или «короткая шпилечная 30 РНК» относятся к двухнитевой структуре, образованной одной самокомплементарной нитью РНК. Конструкции shRNA, содержащие нуклеотидную последовательность, идентичную части, либо кодирующей, либо некодирующей последовательности целевого гена, являются предпочтительными для ингибирования. Было обнаружено, что последовательности РНК с вставками, делециями и одиночными точечными мутациями 35 относительно целевой последовательности также могут быть эффективными для ингибирования. Предпочтительной является идентичность последовательностей, составляющая более 90%, или даже идентичность последовательностей, составляющая 100%, между ингибирующей РНК и частью целевого гена. В определенных предпочтительных вариантах осуществления длина образующей дуплекс части shRNA 40 составляет по меньшей мере 20, 21 или 22 нуклеотида, что, например, соответствует размеру РНК-продуктов, получаемых в результате Dicer-зависимого расщепления. В определенных вариантах осуществления длина shRNA-конструкции составляет по меньшей мере 25, 50, 100, 200, 300 или 400 оснований. В определенных вариантах осуществления длина shRNA-конструкции составляет 400-800 оснований. shRNA- 45 конструкции высоко устойчивы к изменению последовательности петли и размера петли.

Используемый в данном документе термин «рибозим» относится к каталитически активной молекуле РНК, способной к сайт-специфическому расщеплению целевой

мРНК. Были описаны несколько подтипов, например, рибозимы в виде «головки молотка» и «шпильки». Каталитическая активность и стабильность рибозимов может быть улучшена посредством замещения на дезоксирибонуклеотиды рибонуклеотидов в некаталитических основаниях. Хотя для разрушения конкретных мРНК могут быть использованы рибозимы, которые расщепляют мРНК в сайт-специфических последовательностях распознавания, предпочтительным является применение рибозимов в виде «головки молотка». Рибозимы в виде «головки молотка» расщепляют мРНК в положениях, определяемых фланкирующими областями, которые образуют комплементарные пары оснований с целевой мРНК. Единственным требованием является то, чтобы целевая мРНК имела следующую последовательность из двух оснований: 5'-UG-3'. Конструирование и получение рибозимов в виде «головки молотка» хорошо известны из уровня техники.

Предпочтительный способ доставки полинуклеотида, представляющего интерес, который представляет собой siRNA, miRNA, shRNA или рибозим, предусматривает одну или более регуляторных последовательностей, таких как, например, сильный конститутивный промотор pol III, например, промотор U6 snRNA человека, промотор U6 snRNA мыши, промотор H1 РНК человека и мыши и промотор tRNA-val человека, или сильный конститутивный промотор pol II, описываемые в других частях данного документа.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению, независимо от длины кодирующей последовательности как таковой, можно объединять с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы и/или энхансеры, нетранслируемые области (UTR), сигнальные последовательности, последовательности Козак, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты для ферментов рестрикции, сайты множественного клонирования, сайты внутренней посадки рибосомы (IRES), сайты распознавания для рекомбиназ (например, сайты LoxP, FRT и Att), стоп-кодона, сигналы терминации транскрипции и полинуклеотиды, кодирующие саморасщепляющиеся полипептиды, эпитопные метки, как описано в других частях данного документа или как известно из уровня техники, так что их общая длина может значительно изменяться. В связи с этим предполагается, что может быть использован полинуклеотидный фрагмент практически любой длины, при этом общая длина предпочтительно ограничивается простотой получения и применения в предполагаемом протоколе рекомбинантной ДНК.

Полинуклеотиды могут быть получены, подвергнуты манипуляциям и/или экспрессированы с помощью любой из множества хорошо отработанных методик, известных и доступных из уровня техники. Чтобы экспрессировать необходимый полипептид, нуклеотидную последовательность, кодирующую данный полипептид, можно встроить в соответствующий вектор. Примерами векторов являются плазмиды, автономно реплицирующиеся последовательности и мобильные генетические элементы. Дополнительные примеры векторов включают без ограничений плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, а также вирусы животных. Примеры категорий вирусов животных, применимых в качестве векторов, включают без ограничений ретровирус (в том числе лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Примерами векторов экспрессии являются векторы pCIneo (Promega) для экспрессии в клетках

млекопитающих; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ и pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредованного лентивирусами переноса генов и экспрессии в клетках млекопитающих. В конкретных вариантах осуществления последовательности, кодирующие химерные белки, раскрытые в данном документе, могут быть лигированы в такие векторы экспрессии для экспрессии химерного белка в клетках млекопитающих.

В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой эписомный вектор или вектор, который поддерживается экстрахромосомно. Используемый в данном документе термин «эписомный» относится к вектору, который способен реплицироваться без интеграции в хромосомную ДНК хозяина и без постепенной утраты из делящейся клетки-хозяина, что также означает, что указанный вектор реплицируется экстрахромосомно или эписомально. Вектор конструируют с введением в него последовательности, кодирующей точку начала репликации ДНК или «ori» из лимфотрофического вируса герпеса или гамма-герпесвируса, аденовируса, SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота или дрожжей, например, точку начала репликации лимфотрофического вируса герпеса или гамма-герпесвируса, соответствующую oriP EBV. В конкретном аспекте лимфотрофический вирус герпеса может представлять собой вирус Эпштейна-Барр (EBV), герпесвирус, вызывающий саркому Капоши (KSHV), герпесвирус саймири (HS) или вирус болезни Марека (MDV). Вирус Эпштейна-Барр (EBV) и герпесвирус, вызывающий саркому Капоши (KSHV), также являются примерами гамма-герпесвирусов. Как правило, клетка-хозяин содержит белок-трансактиватор вирусной репликации, который активирует репликацию.

«Элементы контроля» или «регуляторные последовательности», присутствующие в векторе экспрессии, представляют собой такие нетранслируемые области вектора — точку начала репликации, кассеты для отбора, промоторы, энхансеры, сигналы инициации трансляции (последовательность Shine Dalgarno или последовательность Козак), интроны, последовательность полиаденилирования, 5' и 3'-нетранслируемые области — которые взаимодействуют с белками клетки-хозяина для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут отличаться по своей силе и специфичности. В зависимости от используемых векторной системы и хозяина можно использовать любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, в том числе универсальные промоторы и индуцируемые промоторы.

В конкретных вариантах осуществления вектор для применения при осуществлении настоящего изобретения на практике, в том числе без ограничения векторы экспрессии и вирусные векторы, будет включать экзогенные, эндогенные или гетерологичные последовательности контроля, такие как промоторы и/или энхансеры. «Эндогенная» последовательность контроля представляет собой последовательность, которая в природных условиях связана с данным геном в геноме. «Экзогенная» последовательность контроля представляет собой последовательность, которая помещена в непосредственное соседство с геном при помощи манипуляции с генами (т. е. методик молекулярной биологии), так что транскрипция данного гена обусловлена связанным энхансером/промотором. «Гетерологичная» последовательность контроля представляет собой экзогенную последовательность, которая происходит от иного вида, чем клетка, подвергаемая генетическим манипуляциям.

Термин «промотор», используемый в данном документе, относится к сайту распознавания полинуклеотида (ДНК или РНК), с которым связывается РНК-полимераза. РНК-полимераза иницирует и транскрибирует полинуклеотиды, функционально связанные с промотором. В конкретных вариантах осуществления промоторы, активные в клетках млекопитающих, содержат богатую АТ область,

расположенную примерно на 25-30 оснований выше сайта инициации транскрипции, и/или другую последовательность, обнаруживаемую на 70-80 оснований выше начала транскрипции, область CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид.

Термин «энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать усиленную транскрипцию и, в некоторых случаях, способные функционировать независимо от их ориентации относительно другой последовательности контроля. Энхансер может функционировать совместно или аддитивно с промоторами и/или другими энхансерными элементами. Термин «промотор/энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать как промоторные, так и энхансерные функции.

Термин «функционально связанный» относится к непосредственному соседству, при котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать надлежащим им образом. В одном варианте осуществления термин относится к функциональной связи между последовательностью контроля экспрессии нуклеиновой кислоты (такой как промотор и/или энхансер) и второй полинуклеотидной последовательностью, например, полинуклеотидом, представляющим интерес, где последовательность контроля экспрессии обеспечивает транскрипцию нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

Используемый в данном документе термин «последовательность контроля конститутивной экспрессии» относится к промотору, энхансеру или промотору/энхансеру, который непрерывно или постоянно обеспечивает возможность транскрипции функционально связанной последовательности. Последовательность контроля конститутивной экспрессии может представлять собой «универсальный» промотор, энхансер или промотор/энхансер, которые обеспечивают возможность экспрессии в самых различных типах клеток и тканей, или «специфический в отношении клетки», «специфический в отношении типа клеток», «специфический в отношении линии клеток» или «специфический в отношении ткани» промотор, энхансер или промотор/энхансер, которые обеспечивают возможность экспрессии в ограниченном количестве типов клеток и тканей, соответственно.

Иллюстративные универсальные последовательности контроля экспрессии, подходящие для применения в конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, включают без ограничений немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), вирусный промотор вируса обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), LTR-промотор вируса мышинного лейкоза Молони (MoMLV), LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназа), H5, P7.5, а также P11-промоторы вируса коровьей оспы, промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1a), фактора раннего ростового ответа 1 (EGR1), ферритина H (FerH), ферритина L (FerL), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), фактора инициации трансляции эукариот 4A1 (EIF4A1), 70 кДа белка теплового шока 5 (HSPA5), 90 кДа белка теплового шока бета, представителя 1 (HSP90B1), 70 кДа белка теплового шока (HSP70), β -кинезина (β -KIN), локуса ROSA 26 человека (Irions et al., Nature Biotechnology 25, 1477 - 1482 (2007)), промотор убиквитина C (UBC), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор из энхансера цитомегаловируса/промотора куриного бета-актина (CAG), промотор β -актина и промотор (MND) с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы, с удаленным участком отрицательного контроля, с сайтом связывания праймера, замещенным на последовательность из dl587rev (Challita et al., J Virol. 69(2):748-55 (1995)).

В одном варианте осуществления вектор по настоящему изобретению содержит MND-промотор.

В одном варианте осуществления вектор по настоящему изобретению содержит EF1a-промотор, содержащий первый интрон человеческого гена EF1a.

5 В одном варианте осуществления вектор по настоящему изобретению содержит EF1a-промотор, не содержащий первый интрон человеческого гена EF1a.

В конкретном варианте осуществления может быть необходима экспрессия полинуклеотида, содержащего CAR, с помощью специфического в отношении Т-клеток промотора.

10 Используемая в данном документе «условная экспрессия» может относиться к любому типу условной экспрессии, в том числе без ограничений индуцируемой экспрессии; репрессированной экспрессии; экспрессии в клетках или тканях, характеризующихся конкретным физиологическим, биологическим или болезненным состоянием и т. д. Данное определение не предназначено для исключения специфической в отношении
15 типа клеток или ткани экспрессии. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрена условная экспрессия полинуклеотида, представляющего интерес, например, экспрессия контролируется путем воздействия на клетку, ткань, организм и т. д. с помощью средства обработки или условия, которые вызывают экспрессию полинуклеотида или которые вызывают повышение или снижение уровня
20 экспрессии полинуклеотида, кодируемого полинуклеотидом, представляющим интерес.

Иллюстративные примеры индуцируемых промоторов/систем включают без ограничений промоторы, индуцируемые стероидами, такие как промоторы генов, кодирующих глюкокортикоидные или эстрогеновые рецепторы (индуцируемые путем
25 обработки соответствующим гормоном), металлотионинный промотор (индуцируемый путем обработки различными тяжелыми металлами), MX-1-промотор (индуцируемый интерфероном), мифепристон-регулируемая система «GeneSwitch» (Sirin et al., 2003, Gene, 323:67), кумат-индуцируемый генный переключатель (WO 2002/088346), тетрациклин-зависимые регуляторные системы и т. д.

Условную экспрессию также можно обеспечить с помощью сайт-специфической
30 ДНК-рекомбиназы. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения вектор содержит по меньшей мере один (как правило два) сайт(а) для рекомбинации, опосредованной сайт-специфической рекомбиназой. Используемые в данном документе термины «рекомбиназа» или «сайт-специфическая рекомбиназа» включают вырезающие или интегративные белки, ферменты, кофакторы
35 или ассоциированные белки, которые вовлекаются в реакции рекомбинации с участием одного или более сайтов рекомбинации (например, двух, трех, четырех, пяти, семи, десяти, двенадцати, пятнадцати, двадцати, тридцати, пятидесяти и т. д.), которые могут быть белками дикого типа (см. Landy, Current Opinion in Biotechnology 3:699-707 (1993)) или их мутантами, производными (например, белками слияния, содержащими
40 последовательности белков для рекомбинации или их фрагменты), фрагментами и вариантами. Иллюстративные примеры рекомбиназ, подходящих для применения в конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, включают без ограничения Cre, Int, IHF, Xis, FLP, Fis, Hin, Gin, ΦC31, Cin, Tn3-резольвазу, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 и ParA.

45 Векторы могут содержать один или более сайтов рекомбинации для любой из самых разнообразных сайт-специфических рекомбиназ. Следует понимать, что целевой сайт для сайт-специфической рекомбиназы является дополнением к любому сайту(ам), необходимому для интеграции вектора, например, ретровирусного или лентивирусного

вектора. Используемые в данном документе термины «последовательность рекомбинации», «сайт рекомбинации» или «сайт сайт-специфической рекомбинации» относятся к конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, которую распознает и с которой связывается рекомбиназа.

5 Например, одним сайтом рекомбинации для рекомбиназы Cre является loxP, который представляет собой последовательность из 34 пар оснований, содержащую два инвертированных повтора из 13 пар оснований (выступающих в роли сайтов связывания рекомбиназы), фланкирующих коровую последовательность из 8 пар оснований (см. ФИГ. 1 из Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Другие примеры
10 сайтов для loxP включают без ограничений lox511 (Hoess et al., 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171 (Lee and Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer et al., 2002), lox71 (Albert et al., 1995) и lox66 (Albert et al., 1995).

Подходящие сайты распознавания для FLP-рекомбиназы включают без ограничений FRT (McLeod, et al., 1996), F₁, F₂, F₃ (Schlake and Bode, 1994), F₄, F₅ (Schlake and Bode, 1994),
15 FRT(LE) (Senecoff et al., 1988), FRT(RE) (Senecoff et al., 1988).

Другими примерами последовательностей распознавания являются последовательности attB, attP, attL и attR, которые распознаются рекомбиназным ферментом λ-интегразой, например, phi-c31. φC31 SSR опосредует рекомбинацию только
20 между гетеротипическими сайтами attB (длиной 34 п. о.) и attP (длиной 39 п. о.) (Groth et al., 2000). Каждый из attB и attP, названные по имени сайтов прикрепления фаговой интегразы в бактериальном или фаговом геномах, соответственно, содержит несовершенные инвертированные повторы, которые, вероятно, связываются гомодимерами φC31 (Groth et al., 2000). Полученные в результате сайты, attL и attR,
25 являются фактически невосприимчивыми к дальнейшей φC31-опосредованной рекомбинации (Belteki et al., 2003), что делает реакцию необратимой. Что касается катализа вставок, было обнаружено, что вставка ДНК, несущей attB, в геномный сайт attP происходит гораздо легче, чем вставка сайта attP в геномный сайт attB (Thyagarajan et al., 2001; Belteki et al., 2003). Таким образом, в типичных стратегиях в определенном локусе с помощью гомологичной рекомбинации размещают attP-несущий «сайт
30 стыковки», который затем кооперируют с attB-несущей входящей последовательностью для вставки.

Используемый в данном документе «сайт внутренней посадки рибосомы» или «IRES» относится к элементу, который содействует непосредственной внутренней посадке рибосомы на кодон инициации, такой как ATG, цистрона (область кодирующая белок)
35 с обеспечением тем самым кэп-независимой трансляции гена. См., например, Jackson et al., 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83; и Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. В конкретных вариантах осуществления векторы, рассмотренные в настоящем изобретении, включают один или более полинуклеотидов, представляющих интерес, которые кодируют один или более полипептидов. В конкретных вариантах
40 осуществления для достижения эффективной трансляции каждого из множества полипептидов полинуклеотидные последовательности можно отделять с помощью одной или более последовательностей IRES или полинуклеотидных последовательностей, кодирующих саморасщепляющиеся полипептиды.

Используемый в данном документе термин «последовательность Козак» относится
45 к короткой нуклеотидной последовательности, которая в значительно облегчает начальное связывание мРНК с малой субъединицей рибосомы и усиливает трансляцию. Консенсусная последовательность Козак представляет собой (GCC)RCCATGG, где R представляет собой пурин (А или G) (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92, и Kozak, 1987. *Nucleic*

Acids Res. 15(20):8125-48). В конкретных вариантах осуществления векторы, рассмотренные в настоящем изобретении, содержат полинуклеотиды, имеющие консенсусную последовательность Козак и кодирующие необходимый полипептид, например, CAR.

5 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в полинуклеотиде или клетке, содержащей полинуклеотид, используют «суицидальный» ген, в том числе индуцируемый «суицидальный» ген, для снижения риска прямой токсичности и/или неконтролируемой пролиферации. В специфических аспектах «суицидальный» ген не является иммуногенным для хозяина, в котором содержится полинуклеотид или клетка.
10 Конкретным примером «суицидального» гена, который можно использовать, является каспаза-9, или каспаза-8, или цитозиндезаминаза. Каспаза-9 может быть активирована с помощью специфического химического индуктора димеризации (CID).

В определенных вариантах осуществления векторы содержат генные сегменты, которые делают иммунные эффекторные клетки по настоящему изобретению, например,
15 Т-клетки, восприимчивыми к негативной селекции *in vivo*. Под «негативной селекцией» подразумевают, что введенная клетка может быть элиминирована при изменении в *in vivo* состоянии индивидуума. Негативно селектируемый фенотип может возникнуть в результате вставки гена, который придает чувствительность к вводимому средству, например, соединению. Негативно селектируемые гены известны из уровня техники и
20 включают, среди прочего, следующие гены: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса типа I (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 11:223, 1977), который придает чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT) и ген бактериальной цитозиндезаминазы (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

25 В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, содержат полинуклеотид, дополнительно содержащий позитивный маркер, который обеспечивает селекцию клеток с негативно селектируемым фенотипом *in vitro*. Позитивно селектируемый маркер может представлять собой ген, который, будучи введенным в клетку-хозяина, экспрессирует
30 доминантный фенотип, допускающий позитивную селекцию клеток, несущих данный ген. Гены этого типа хорошо известны из уровня техники и включают, среди прочего, ген гигромицин-В-фосфотрансферазы (hph), который придает устойчивость к гигромицину-В, ген аминогликозидфосфотрансферазы (neo или aph) из Tn5, который кодирует устойчивость к антибиотику G418, ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), ген
35 аденозиндезаминазы (ADA) и ген множественной лекарственной устойчивости (MDR).

Предпочтительно позитивно селектируемый маркер и негативно селектируемый элемент связаны, так что утрата негативно селектируемого элемента обязательно сопровождается также утратой позитивно селектируемого маркера. Еще более
40 предпочтительным является слияние позитивного и негативного селектируемых маркеров, так что утрата одного неизбежно ведет к утрате другого. Примером слитого полинуклеотида, продуктом экспрессии которого является полипептид, который придает одновременно признаки, необходимые для позитивной и негативной селекции, описанные выше, является слитый ген гигромицинфосфотрансферазы и тимидинкиназы (HuTK). В результате экспрессии этого гена образуется полипептид, который придает
45 устойчивость к гигромицину В для позитивной селекции *in vitro*, а также чувствительность к ганцикловиру для негативной селекции *in vivo*. См. Lupton S. D., et al, Mol. and Cell. Biology 11:3374- 3378, 1991. Кроме того, в предпочтительных вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению, кодирующие химерные рецепторы,

находятся в ретровирусных векторах, содержащих слитый ген, в частности, придающий устойчивость к гигромицину В для позитивной селекции *in vitro*, а также чувствительность к ганцикловиру для негативной селекции *in vivo*, например, в ретровирусном векторе с НуТК, описанном в Lupton, S. D. et al. (1991), выше. См. также публикации PCT US91/08442 и PCT/US94/05601, от S. D. Lupton, описывающие применение бифункциональных селектируемых слитых генов, полученных путем слияния доминантных позитивных селектируемых маркеров с негативными селектируемыми маркерами.

Предпочтительные позитивные селектируемые маркеры происходят из генов, выбранных из группы, включающей *hph*, *neo* и *gpt*, а предпочтительные негативные селектируемые маркеры происходят из генов, выбранных из группы, включающей цитозиндезаминазу, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT и *gpt*. Особенно предпочтительные маркеры представляют собой бифункциональные селектируемые слитые гены, при этом позитивный селектируемый маркер происходит из *hph* или *neo*, а негативный селектируемый маркер происходит из цитозиндезаминазы, или гена или селектируемого маркера ТК. Индуцируемые «суицидальные» гены

Г. Вирусные векторы

В конкретных вариантах осуществления клетку (например, иммунную эффекторную клетку) трансдуцируют с помощью ретровирусного вектора, например, лентивирусного вектора, кодирующего CAR. Например, иммунную эффекторную клетку трансдуцируют с помощью вектора, кодирующего CAR, который содержит гуманизированное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид ВСМА, вместе с внутриклеточным доменом передачи сигнала CD3 ζ , CD28, 4-1BB, Oх40 или любыми их комбинациями. Таким образом, эти трансдуцированные Т-клетки могут вызывать CAR-опосредованный цитотоксический ответ.

Ретровирусы представляют собой обычный инструмент для генной доставки (Miller, 2000, Nature. 357: 455-460). В конкретных вариантах осуществления ретровирус применяют для доставки в клетку полинуклеотида, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR). Используемый в данном документе термин «ретровирус» относится к РНК-вирусу, который обратно транскрибирует свою геномную РНК в линейную двухнитевую ДНК-копию, а затем ковалентно интегрирует свою геномную ДНК в геном хозяина. После того как вирус интегрируется в геном хозяина, он называется «провирусом». Провирус служит в качестве шаблона для РНК-полимеразы II и управляет экспрессией молекул РНК, которые кодируют структурные белки и ферменты, необходимые для образования новых вирусных частиц.

Иллюстративные ретровирусы, подходящие для применения в конкретных вариантах осуществления, включают без ограничений: вирус мышинного лейкоза Молони (M-MuLV), вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус лейкоза мышей Френда, вирус стволовых клеток мышей (MSCV), а также вирус саркомы Рауса (RSV) и лентивирус.

Используемый в данном документе термин «лентивирус» относится к группе (или роду) сложных ретровирусов. Иллюстративные лентивирусы включают без ограничений: HIV (вирус иммунодефицита человека; в том числе HIV 1 типа и HIV 2 типа); вирус висна-маэди (VMV); вирус артрита-энцефалита коз (CAEV); вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV); вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). В одном варианте осуществления предпочтительными являются векторные остоны на основе HIV (т. е. цис-действующие элементы последовательности HIV). В конкретных вариантах

осуществления лентивирус применяют для доставки в клетку полинуклеотида, содержащего CAR.

Ретровирусные векторы и, более конкретно, лентивирусные векторы могут применяться при осуществлении конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения на практике. Соответственно, используемый в данном документе термин «ретровирус» или «ретровирусный вектор» подразумевает включение «лентивируса» и «лентивирусных векторов» соответственно.

Используемый в данном документе термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Переносимая нуклеиновая кислота обычно связана с векторной молекулой нуклеиновой кислоты, например, вставлена в нее. Вектор может содержать последовательности, которые управляют автономной репликацией в клетке, или может содержать последовательности, достаточные для обеспечения интеграции в ДНК клетки-хозяина. Применимые векторы включают, например, плазмиды (например, ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды, бактериальные искусственные хромосомы и вирусные векторы. Применимые вирусные векторы включают, например, ретровирусы и лентивирусы с дефектной системой репликации.

Как будет очевидно специалисту в данной области, термин «вирусный вектор» широко используется для обозначения либо молекулы нуклеиновой кислоты (например, плазмиды-переносчика), которая включает элементы, происходящие из нуклеиновой кислоты вируса, которые, как правило, облегчают перенос молекулы нуклеиновой кислоты или ее интеграцию в геном клетки, либо вирусной частицы, которая опосредует перенос нуклеиновой кислоты. Вирусные частицы, как правило, будут включать различные вирусные компоненты и иногда также компоненты клетки-хозяина в дополнение к нуклеиновой кислоте(ам).

Термин «вирусный вектор» может относиться либо к вирусу или вирусной частице, способным переносить нуклеиновую кислоту в клетку, либо к переносимой нуклеиновой кислоте самой по себе. Вирусные векторы и плазмиды-переносчики содержат структурные и/или функциональные генетические элементы, которые происходят преимущественно из вируса. Термин «ретровирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащим структурные и функциональные генетические элементы или их части, которые происходят преимущественно из ретровируса. Термин «лентивирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащим структурные и функциональные генетические элементы или их части, в том числе LTR, которые происходят преимущественно из лентивируса. Термин «гибридный вектор» относится к вектору, LTR или другой нуклеиновой кислоте, содержащим как ретровирусные например, лентивирусные, последовательности, так и вирусные последовательности, не являющиеся лентивирусными. В одном варианте осуществления гибридный вектор относится к вектору или плазмиде-переносчику, содержащим ретровирусные, например, лентивирусные, последовательности для обратной транскрипции, репликации, интеграции и/или упаковки.

В конкретных вариантах осуществления термины «лентивирусный вектор», «лентивирусный вектор экспрессии» могут использоваться в отношении лентивирусных плазмид-переносчиков и/или инфекционных лентивирусных частиц. Если в данном документе ссылаются на элементы, такие как сайты клонирования, промоторы, регуляторные элементы, гетерологичные нуклеиновые кислоты и т.д., следует понимать, что последовательности таких элементов представлены в форме РНК в лентивирусных частицах по настоящему изобретению и представлены в форме ДНК в ДНК-плазмидах

по настоящему изобретению.

На каждом конце провируса находятся структуры, называемые «длинными концевыми повторами» или «LTR». Термин «длинный концевой повтор (LTR)» относится к доменам из пар оснований, расположенных на концах ретровирусных ДНК, которые в контексте их природных последовательностей представляют собой прямые повторы и содержат области U3, R и U5. LTR, как правило, обеспечивают функции, существенно важные для экспрессии генов ретровируса (например, обеспечивают индукцию, инициацию и полиаденилирование генных транскриптов) и для репликации вируса. LTR содержит множество регуляторных сигналов, в том числе элементы контроля транскрипции, сигналы полиаденилирования и последовательности, необходимые для репликации и интеграции вирусного генома. Вирусный LTR разделен на три области, называемые U3, R и U5. U3-область содержит энхансерные и промоторные элементы. U5-область представляет собой последовательность между сайтом связывания праймера и R-областью и содержит последовательность полиаденилирования. R (повтор)-область фланкирована U3- и U5-областями. LTR состоит из U3-, R- и U5-областей и находится на обоих 5'- и 3'-концах вирусного генома. Рядом с 5' LTR находятся последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома (сайт связывания праймера тРНК) и для эффективной упаковки вирусной РНК в частицы (Psi-сайт).

Используемый в данном документе термин «сигнал упаковки» или «последовательность упаковки» относится к последовательностям, расположенным в пределах ретровирусного генома, которые необходимы для вставки вирусной РНК в вирусный капсид или частицу, см., например, Clever et al., 1995. J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101–2109. В некоторых ретровирусных векторах используется минимальный сигнал упаковки (также называемый psi [Ψ]-последовательность), необходимый для заключения вирусного генома в капсид. Таким образом, используемые в данном документе термины «последовательность упаковки», «сигнал упаковки», «psi» и символ «Ψ» применяются в отношении некодирующей последовательности, необходимой для заключения нитей ретровирусной РНК в капсид во время сборки вирусной частицы.

В различных вариантах осуществления векторы содержат модифицированные 5' LTR и/или 3' LTR. Каждый или оба LTR могут содержать одну или более модификаций, в том числе без ограничений одну или более делеций, вставок или замен. Зачастую модификации в 3' LTR осуществляют для повышения безопасности лентивирусных или ретровирусных систем путем придания вирусам дефектности по репликации.

Используемый в данном документе термин «дефектный по репликации» относится к вирусу, который не способен к полноценной, эффективной репликации, так что не происходит образования инфекционных вирионов (например, дефектное по репликации лентивирусное потомство). Термин «компетентный по репликации» относится к вирусу дикого типа или мутантному вирусу, который способен к репликации, так что вирусная репликация вируса приводит к образованию инфекционных вирионов (например, компетентное по репликации лентивирусное потомство).

Термин «самоинактивирующиеся» (SIN) векторы относится к дефектным по репликации векторам, например, ретровирусным или лентивирусным векторам, в которых область энхансер-промотор правого (3') LTR, известная как U3-область, была модифицирована (например, посредством делеции или замены) для предотвращения вирусной транскрипции после первого цикла вирусной репликации. Это происходит потому, что во время вирусной репликации U3-область правого (3') LTR используется как шаблон для U3-области левого (5') LTR, и, таким образом, вирусный транскрипт не может быть получен без энхансера-промотора в U3. В дополнительном варианте

осуществления настоящего изобретения 3' LTR модифицируют таким образом, что замещена U5-область, например, идеальной последовательностью поли-(А). Следует отметить, что модификации LTR, такие как модификации 3' LTR, 5' LTR, или как 3', так и 5' LTR, также включены в объем настоящего изобретения.

5 Дополнительное усиление безопасности обеспечивают замещением U3-области 5' LTR гетерологичным промотором для управления транскрипцией вирусного генома во время образования вирусных частиц. Примеры гетерологичных промоторов, которые могут быть использованы, включают, например, вирусный промотор вируса обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), промотор цитомегаловируса (CMV) (например, немедленно-ранний), промотор вируса мышинного лейкоза Молони (MoMLV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV) и промотор вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназа). Типичные промоторы способны обеспечивать высокие уровни транскрипции Tat-независимым образом. Такое замещение снижает возможность рекомбинации с получением компетентных по репликации вирусов, поскольку в системе 15 продукции вируса отсутствует полная последовательность U3. В определенных вариантах осуществления гетерологичный промотор имеет дополнительные преимущества в контроле способа, посредством которого транскрибируется вирусный геном. Например, гетерологичный промотор может быть индуцируемым, так что транскрипция всего или части вирусного генома будет происходить только в присутствии 20 индуцирующих факторов. Индуцирующие факторы включают без ограничений одно или более химических соединений или физиологических условий, таких как температура или pH, при которых культивируются клетки-хозяева.

В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы содержат элемент TAR. Термин «TAR» относится к генетическому элементу «трансактивационного ответа», 25 расположенному в R-области лентивирусных (например, HIV) LTR. Данный элемент взаимодействует с лентивирусным трансактиваторным (tat) генетическим элементом для усиления вирусной репликации. Однако данный элемент не является необходимым в вариантах осуществления, где U3-область 5' LTR замещена гетерологичным промотором.

30 «R-область» относится к области в пределах ретровирусных LTR, начинающейся от начала кэпирующей группы (т. е. точки начала транскрипции) и заканчивающейся непосредственно перед началом поли-А-тракта. R-область также определяют как фланкированную U3- и U5-областями. R-область играет важную роль во время обратной транскрипции, обеспечивая перенос растущей нити ДНК от одного конца генома к 35 другому.

Используемый в данном документе термин «FLAP-элемент» относится к нуклеиновой кислоте, последовательность которой содержит центральный полипуриновый тракт и центральные последовательности терминации (сPPT и CTS) ретровируса, например, HIV-1 или HIV-2. Подходящие FLAP-элементы описаны в патенте США № 6682907 и 40 в Zennou, et al., 2000, Cell, 101:173. Во время обратной транскрипции HIV-1 центральная инициация плюс-нити ДНК в центральном полипуриновом тракте (сPPT) и центральная терминация в центральной последовательности терминации (CTS) приводит к образованию трехнитевой ДНК-структуры: центрального ДНК-флэпа HIV-1. Без желания быть связанными какой-либо теорией, ДНК-флэп может действовать как цис- 45 активная детерминанта ядерного импорта лентивирусного генома и/или может повышать титр вируса. В конкретных вариантах осуществления ретровирусный или лентивирусный векторные остовы содержат один или более FLAP-элементов, расположенных в векторах выше или ниже гетерологичных генов, представляющих

интерес. Например, в конкретных вариантах осуществления плаزمид-переносчик содержит FLAP-элемент. В одном варианте осуществления вектор по настоящему изобретению содержит FLAP-элемент, выделенный из HIV-1.

В одном варианте осуществления ретровирусные или лентивирусные векторы-переносчики содержат один или более экспортных элементов. Термин «экспортный элемент» относится к цис-действующему посттранскрипционному регуляторному элементу, который регулирует транспорт РНК-транскрипта из ядра в цитоплазму клетки. Примеры РНК-экспортных элементов включают без ограничений элемент rev-ответа (RRE) вируса иммунодефицита человека (HIV) (см., например, Cullen et al., 1991. J. Virol. 65: 1053; и Cullen et al., 1991. Cell 58: 423) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE). Как правило, РНК-экспортный элемент расположен в пределах 3' UTR гена и может быть встроен в виде одной или множественных копий.

В конкретных вариантах осуществления экспрессию гетерологичных последовательностей в вирусных векторах повышают посредством внедрения в векторы посттранскрипционных регуляторных элементов, эффективных сайтов полиаденилирования и, необязательно, сигналов терминации транскрипции. Разнообразные посттранскрипционные регуляторные элементы могут увеличивать экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в белок, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE; Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73:2886); посттранскрипционный регуляторный элемент, присутствующий в вирусе гепатита В (HPRE) (Huang et al., Mol. Cell. Biol., 5:3864); и подобные (Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766). В конкретных вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению содержат посттранскрипционный регуляторный элемент, такой как WPRE или HPRE.

В конкретных вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению лишены или не содержат посттранскрипционный регуляторный элемент, такой как WPRE или HPRE, поскольку в некоторых случаях такие элементы повышают риск трансформации клетки и/или не увеличивают в существенной или значительной степени количество мРНК-транскрипта или не повышают стабильность мРНК. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению лишены или не содержат WPRE или HPRE в качестве дополнительной меры безопасности.

Элементы, управляющие эффективной терминацией или полиаденилированием транскриптов гетерологичных нуклеиновых кислот, увеличивают экспрессию гетерологичных генов. Сигналы терминации транскрипции, как правило, находятся ниже сигнала полиаденилирования. В конкретных вариантах осуществления векторы содержат последовательность полиаденилирования в направлении 3' от полинуклеотида, кодирующего полипептид, подлежащий экспрессии. Используемый в данном документе термин «сайт поли(А)» или «поли(А)-последовательность» обозначает последовательность ДНК, которая управляет как терминацией, так и полиаденилированием растущей нити РНК-транскрипта с помощью РНК-полимеразы II. Последовательности полиаденилирования могут повышать стабильность мРНК путем добавления поли(А)-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности, тем самым, содействуя увеличению эффективности трансляции. Эффективное полиаденилирование рекомбинантного транскрипта необходимо, поскольку транскрипты, лишенные поли(А)-хвоста, являются нестабильными и легко подвергаются деградации. Иллюстративные примеры поли(А)-сигналов, которые могут быть использованы в векторе по настоящему изобретению, включают идеальную поли(А)-последовательность (например, AATAAA, ATTAAA, AGTAAA), поли(А)-

последовательность бычьего гормона роста (BGHPA), поли(А)-последовательность β -глобина кролика (g β grA) или другую подходящую гетерологичную или эндогенную поли(А)-последовательность, известную из уровня техники.

В определенных вариантах осуществления ретровирусный или лентивирусный вектор
 5 дополнительно содержит один или более инсуляторных элементов. Инсуляторные
 элементы могут способствовать защите последовательностей, экспрессируемых
 лентивирусом, например, терапевтических полипептидов, от эффектов сайтов
 интеграции, которые могут быть опосредованы цис-действующими элементами,
 присутствующими в геномной ДНК и приводящими к ослаблению контроля экспрессии
 10 перенесенной последовательности (т. е. эффект положения; см., например, Burgess-
 Beusse et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:16433; и Zhan et al., 2001, Hum. Genet.,
 109:471). В некоторых вариантах осуществления векторы-переносчики содержат один
 или более инсуляторных элементов в 3' LTR, и после интеграции провируса в геном
 хозяина провирус содержит один или более инсуляторов как в 5' LTR, так и в 3' LTR за
 15 счет дубликации 3' LTR. Инсуляторы, подходящие для применения по настоящему
 изобретению, включают без ограничений инсулятор куриного β -глобина (см. Chung et
 al., 1993. Cell 74:505; Chung et al., 1997. PNAS 94:575; и Bell et al., 1999. Cell 98:387,
 включенные в данный документ посредством ссылки). Примеры инсуляторных
 элементов включают без ограничений инсулятор из локуса β -глобина, такой как куриный
 20 HS4.

В соответствии с некоторыми специфическими вариантами осуществления настоящего
 изобретения большинство или все последовательности остовов вирусных векторов
 происходят из лентивируса, например, HIV-1. Однако, следует понимать, что можно
 использовать или объединять множество различных источников ретровирусных и/или
 25 лентивирусных последовательностей, а также множество замен и изменений можно
 поместить в некоторые лентивирусные последовательности без ухудшения способности
 вектора-переносчика выполнять функции, описанные в данном документе. Более того,
 из уровня техники известно множество лентивирусных векторов, см. Naldini et al., (1996a,
 1996b и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США №№ 6013516; и 5994136,
 30 многие из которых могут быть адаптированы для получения вирусного вектора или
 плазмиды-переносчика по настоящему изобретению.

В различных вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению содержат
 промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид
 CAR. Векторы могут содержать один или более LTR, при этом каждый LTR содержит
 35 одну или более модификаций, таких как одна или более нуклеотидных замен, добавлений
 или делеций. Векторы могут дополнительно содержать один или более вспомогательных
 элементов для повышения эффективности трансдукции (например, cPPT/FLAP), упаковки
 вируса (например, Psi (Ψ) сигнал упаковки, RRE) и/или другие элементы, которые
 повышают экспрессию терапевтического гена (например, поли(А)-последовательности),
 40 и могут необязательно содержать WPRE или HPRE.

В конкретном варианте осуществления вектор-переносчик по настоящему
 изобретению содержит левый (5') ретровирусный LTR, центральный полипуриновый
 тракт/ДНК-флэп (cPPT/FLAP), ретровирусный экспортный элемент, промотор, активный
 в Т-клетке, который функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим
 45 полипептид CAR, рассмотренный в данном документе, и правый (3') ретровирусный
 LTR, а также необязательно WPRE или HPRE.

В конкретном варианте осуществления вектор-переносчик по настоящему
 изобретению содержит левый (5') ретровирусный LTR, ретровирусный экспортный

элемент, промотор, активный в Т-клетке, который функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, рассмотренный в данном документе, правый (3') ретровирусный LTR и поли(А)-последовательность, а также необязательно WPRE или HPRE. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения

5 предусмотрен лентивирусный вектор, содержащий левый (5') LTR, cPPT/FLAP, RRE, промотор, активный в Т-клетке, который функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, рассмотренный в данном документе, правый (3') LTR и последовательность полиаденилирования, а также необязательно WPRE или HPRE.

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен

10 лентивирусный вектор, содержащий левый (5') LTR HIV-1, Psi (Ψ) сигнал упаковки, cPPT/FLAP, RRE, промотор, активный в Т-клетке, который функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, рассмотренный в данном документе, правый (3') самоинактивирующийся (SIN) LTR HIV-1 и последовательность полиаденилирования β -глобина кролика, а также необязательно WPRE или HPRE.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен вектор, содержащий по меньшей мере один LTR, центральный полипуриновый тракт/ДНК-флэп (cPPT/FLAP), ретровирусный экспортный элемент и промотор, активный в Т-клетке, который функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, рассмотренный в данном документе, а также необязательно WPRE или HPRE.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен вектор, содержащий по меньшей мере один LTR, cPPT/FLAP, RRE, промотор, активный в Т-клетке, который функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, рассмотренный в данном документе, и последовательность полиаденилирования, а также необязательно WPRE или HPRE.

В определенном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен по меньшей мере один SIN LTR HIV-1, Psi (Ψ) сигнал упаковки, cPPT/FLAP, RRE; промотор, активный в Т-клетке, который функционально связан с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, рассмотренный в данном документе, и последовательность полиаденилирования β -глобина кролика, а также необязательно WPRE или HPRE.

«Клетка-хозяин» включает клетки, подвергнутые электропорации, трансфекции, инфицированию или трансдукции *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro* с применением рекомбинантного вектора или полинуклеотида по настоящему изобретению. Клетки-хозяева могут включать упаковывающие клетки, продуцирующие клетки и клетки, инфицированные вирусными векторами. В конкретных вариантах осуществления

35 клетки-хозяева, инфицированные вирусным вектором по настоящему изобретению, вводят субъекту, нуждающемуся в терапии. В определенных вариантах осуществления термин «целевая клетка» используется взаимозаменяемо с термином «клетка-хозяин» и относится к клеткам необходимого типа, подвергнутым трансфекции, инфицированию или трансдукции. В предпочтительных вариантах осуществления целевая клетка

40 представляет собой Т-клетку.

Для получения приемлемого титра вируса зачастую необходимо крупномасштабное получение вирусных частиц. Вирусные частицы получают посредством трансфекции вектора-переносчика в упаковывающую клеточную линию, которая содержит структурные и/или вспомогательные гены вируса, например, гены gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpr, vpx или nef или другие гены ретровируса.

Используемый в данном документе термин «упаковочный вектор» относится к вектору экспрессии или вирусному вектору, который лишен сигнала упаковки и содержит полинуклеотид, кодирующий один, два, три, четыре или более структурных и/или

вспомогательных генов вируса. Обычно упаковочные векторы включают в упаковывающую клетку, и их вводят в клетку посредством трансфекции, трансдукции и инфекции. Способы трансфекции, трансдукции и инфекции хорошо известны специалистам в данной области. Ретровирусный/лентивирусный вектор-переносчик по настоящему изобретению может быть введен в упаковывающую клеточную линию посредством трансфекции, трансдукции и инфекции с получением продуцирующей клетки или клеточной линии. Упаковочные векторы по настоящему изобретению могут быть введены в человеческие клетки или клеточные линии с помощью стандартных способов, в том числе, например, трансфекции с использованием фосфата кальция, липофекции или электропорации. В некоторых вариантах осуществления упаковочные векторы вводят в клетки совместно с доминантным селектируемым маркером, таким как неомицин, гигромицин, пурамицин, бластоцидин, зеоцин, тимидинкиназа, DHFR, глутаминсинтетаза или ADA, с последующей селекцией в присутствии соответствующего лекарственного средства и выделением клонов. Ген селектируемого маркера может быть физически связан с генами, закодированными в упаковочном векторе, например, посредством IRES или саморасщепляющихся вирусных пептидов.

Белки вирусной оболочки (env) определяют диапазон клеток-хозяев, которые в конечном итоге могут быть инфицированы и трансформированы посредством рекомбинантных ретровирусов, полученных из клеточных линий. В случае лентивирусов, таких как HIV-1, HIV-2, SIV, FIV и EIV, белки env включают gp41 и gp120. Предпочтительно вирусные белки env, экспрессируемые упаковывающими клетками по настоящему изобретению, закодированы в отдельном векторе, не содержащем вирусные гены gag и pol, как было ранее описано.

Иллюстративные примеры происходящих из ретровирусов генов env, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают без ограничений гены оболочек MLV, оболочки 10A1, оболочек BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, вируса Эбола, вируса Сэндай, FPV (вируса чумы домашней птицы) и вируса гриппа. Аналогично могут быть использованы гены, кодирующие оболочки РНК-вирусов (например, РНК-вирусов из семейств Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae), а также ДНК-вирусов (семейства Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae и Iridoviridae). Типичные примеры включают FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, вирус бешенства, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 и EIAV.

В других вариантах осуществления белки оболочки для псевдотипирования вируса по настоящему изобретению включают без ограничений белки любого из следующих вирусов: вируса гриппа А, такого как H1N1, H1N2, H3N2 и H5N1 (птичий грипп), вируса гриппа В, вируса гриппа С, вируса гепатита А, вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса гепатита D, вируса гепатита Е, ротавируса, любого вируса из группы норовирусов, кишечных аденовирусов, парвовируса, вируса лихорадки Денге, вируса оспы обезьян, вирусов порядка Mononegavirales, лиссавируса, такого как вирус бешенства, вирус летучих мышей острова Лагос, вирус Мокола, вирус Дювенхага, вирус европейских летучих мышей 1 и 2 типа и вирус австралийских летучих мышей, эфемеровируса, везикуловируса, вируса везикулярного стоматита (VSV), герпесвирусов, таких как вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр (EBV), вирус герпеса человека (HHV), вирус герпеса человека 6 и 8 типа, вируса иммунодефицита человека (HIV), папилломавируса, мышинного

гаммагерпесвируса, аренавирусов, таких как вирус аргентинской геморрагической лихорадки, вирус боливийской геморрагической лихорадки, вирус Сабиа, ассоциированный с геморрагической лихорадкой, вирус венесуэльской геморрагической лихорадки, вирус лихорадки Ласса, вирус Мачупо, вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), Bunyaviridae, таких как вирус конго-крымской геморрагической лихорадки, хантавирус, вирус, вызывающий геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, вирус лихорадки Рифт-Валли, Filoviridae (филовир), в том числе вируса геморрагической лихорадки Эбола и геморрагической лихорадки Марбург, Flaviviridae, в том числе вируса киасанурской лесной болезни, вируса омской геморрагической лихорадки, вируса, вызывающего клещевой энцефалит, и Paramyxoviridae, таких как вирус Хендра и вирус Нипах, вирусы Variola major и Variola minor (вирусы натуральной оспы), альфавирусов, таких как вирус венесуэльского энцефалита лошадей, вирус восточного энцефалита лошадей, вирус западного энцефалита лошадей, SARS-ассоциированного коронавируса (SARS-CoV), вируса Западного Нила и любого вируса, вызывающего энцефалит.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены упаковывающие клетки, которые продуцируют рекомбинантный ретровирус, например, лентивирус, псевдотипированный с помощью гликопротеина VSV-G.

Используемые в данном документе термины «псевдотипировать» или «псевдотипирование» относятся к вирусу, белки оболочки которого были замещены на белки другого вируса, обладающего предпочтительными характеристиками. Например, HIV может быть псевдотипирован с помощью белков оболочки, представляющих собой G-белок вируса везикулярного стоматита (VSV-G), что обеспечивает возможность HIV инфицировать более широкий спектр клеток, поскольку белки оболочки HIV (кодируемые геном env) в норме нацеливают вирус на CD4+ клетки. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения белки оболочки лентивируса псевдотипированы с помощью VSV-G. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены упаковывающие клетки, которые продуцируют рекомбинантный ретровирус, например, лентивирус, псевдотипированный с помощью гликопротеина оболочки VSV-G.

Используемый в данном документе термин «упаковывающие клеточные линии» применяют при ссылке на клеточные линии, которые не содержат сигнал упаковки, но при этом стабильно или транзистентно экспрессируют структурные белки и ферменты репликации вируса (например, gag, pol и env), которые необходимы для правильной упаковки вирусных частиц. Для получения упаковывающих клеток по настоящему изобретению можно использовать любую подходящую клеточную линию. Как правило, указанные клетки являются клетками млекопитающих. В конкретном варианте осуществления клетки, используемые для получения упаковывающей клеточной линии, являются человеческими клетками. Подходящие клеточные линии, которые можно использовать, включают, например, клетки CHO, клетки BHK, клетки MDCK, клетки C3H 10T1/2, клетки FLY, клетки Psi-2, клетки BOSC 23, клетки PA317, клетки WENI, клетки COS, клетки BSC 1, клетки BSC 40, клетки BMT 10, клетки VERO, клетки W138, клетки MRC5, клетки A549, клетки HT1080, клетки 293, клетки 293T, клетки B-50, клетки 3T3, клетки NIH3T3, клетки HepG2, клетки Saos-2, клетки Huh7, клетки HeLa, клетки W163, клетки 211 и клетки 211A. В предпочтительных вариантах осуществления упаковывающие клетки представляют собой клетки 293, клетки 293T или клетки A549. В другом предпочтительном варианте осуществления клетки представляют собой клетки A549.

Используемый в данном документе термин «продуцирующая клеточная линия» относится к клеточной линии, которая способна продуцировать рекомбинантные ретровирусные частицы, при этом она включает упаковывающую клеточную линию и конструкцию вектора-переносчика, содержащую сигнал упаковки. Получение

5 инфекционных вирусных частиц и исходных растворов вируса можно выполнять с применением традиционных методик. Способы получения исходных растворов вируса известны из уровня техники и проиллюстрированы, например, в Y. Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633, и N. R. Landau et al. (1992) J. Virol. 66:5110-5113. Инфекционные вирусные частицы можно собирать из упаковывающих клеток с применением

10 традиционных методик. Например, инфекционные частицы можно собирать при помощи лизиса клеток или сбора супернатанта культуры клеток, как известно из уровня техники. При необходимости собранные вирусные частицы необязательно могут быть очищены. Подходящие методики очистки хорошо известны специалистам в данной области.

Доставка гена(ов) или другой полинуклеотидной последовательности с применением

15 ретровирусного или лентивирусного вектора посредством вирусной инфекции, а не трансфекции, называется «трансдукцией». В одном варианте осуществления ретровирусные векторы трансдуцируют в клетку посредством инфекции и интеграции провируса. В определенных вариантах осуществления целевая клетка, например, Т-клетка, является «трансдуцированной», если она содержит ген или другую

20 полинуклеотидную последовательность, доставленную в клетку посредством инфекции с применением вирусного или ретровирусного вектора. В конкретных вариантах осуществления трансдуцированная клетка содержит один или более генов или других полинуклеотидных последовательностей, доставленных в клеточный геном с помощью ретровирусного или лентивирусного вектора.

В конкретных вариантах осуществления клетки-хозяева, трансдуцированные вирусным вектором по настоящему изобретению, который экспрессирует один или более полипептидов, вводят субъекту для лечения и/или предупреждения В-клеточного злокачественного новообразования. Другие способы, связанные с применением

25 вирусных векторов в генной терапии, которые могут быть использованы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, описаны, например,

30 в Kay, M. A. (1997) Chest 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) Hum. Gene Ther. 9:1975-81; Shiratory, Y. et al. (1999) Liver 19:265-74; Oka, K. et al. (2000) Curr. Opin. Lipidol. 11:179-86; Thule, P. M. and Liu, J. M. (2000) Gene Ther. 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12:335-56; Alt, M. (1995) J. Hepatol. 23:746-58; Brody, S. L. and

35 Crystal, R. G. (1994) Ann. N.Y. Acad. Sci. 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) Expert Opin. Investig. Drugs 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) Curr. Cardiol. Rep. 3:43-49; и Lee, H. C. et al. (2000) Nature 408:483-8.

Г. Генетически модифицированные клетки

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения рассмотрены

40 клетки, генетически модифицированные для экспрессии CAR, рассмотренных в данном документе, для применения в лечении состояний, связанных с В-клетками. Используемый в данном документе термин «полученный методами генной инженерии» или «генетически модифицированный» относится к добавлению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал клетки. Термины «генетически

45 модифицированные клетки», «модифицированные клетки» и «перенаправленные клетки» используются взаимозаменяемо. Используемый в данном документе термин «генная терапия» относится к введению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал клетки, что восстанавливает,

корректирует или модифицирует экспрессию гена или служит для экспрессии терапевтического полипептида, например, CAR.

В конкретных вариантах осуществления CAR, рассмотренные в данном документе, вводятся и экспрессируются в иммунных эффекторных клетках, чтобы перенаправить их специфичность на целевой антиген, представляющий интерес, например, полипептид ВСМА. «Иммунная эффекторная клетка» представляет собой любую клетку иммунной системы, которая характеризуется одной или более эффекторными функциями (например, цитолитической активностью цитотоксической клетки, секрецией цитокинов, индукцией ADCC и/или CDC).

Иммунные эффекторные клетки по настоящему изобретению могут быть аутологичными/аутогенными («своими») или неаутологичными («не своими», например, аллогенными, сингенными или ксеногенными).

«Аутологичные», как используется в данном документе, относится к клеткам от того же субъекта.

«Аллогенные», как используется в данном документе, относится к клеткам того же вида, которые генетически отличны от сравниваемой клетки.

«Сингенные», как используется в данном документе, относится к клеткам другого субъекта, которые генетически идентичны со сравниваемой клеткой.

«Ксеногенные», как используется в данном документе, относится к клеткам другого вида относительно сравниваемой клетки. В предпочтительных вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению являются аллогенными.

Иллюстративные иммунные эффекторные клетки, используемые с CAR, рассмотренными в данном документе, включают Т-лимфоциты. Термины «Т-клетка» или «Т-лимфоцит» приняты в данной области техники и подразумевают включение тимоцитов, незрелых Т-лимфоцитов, зрелых Т-лимфоцитов, покоящихся Т-лимфоцитов или активированных Т-лимфоцитов. Т-клетка может представлять собой Т-хелперную клетку (Th), например, Т-хелперную клетку 1 типа (Th1) или Т-хелперную клетку 2 типа (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; CD4⁺ Т-клетку), CD4⁺ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; CD8⁺ Т-клетку), CD4⁺CD8⁺ Т-клетку, CD4⁺CD8⁻ Т-клетку или любую другую субпопуляцию Т-клеток. Другие иллюстративные популяции Т-клеток, подходящие для применения в конкретных вариантах осуществления, включают наивные Т-клетки и Т-клетки памяти.

Как будет понятно специалисту в данной области, другие клетки также можно использовать в качестве иммунных эффекторных клеток с CAR, описанными в данном документе. В частности, иммунные эффекторные клетки также включают НК-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Иммунные эффекторные клетки также включают предшественников эффекторных клеток, где такие клетки-предшественники можно индуцировать к дифференциации в иммунные эффекторные клетки *in vivo* или *in vitro*.

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка включает предшественников иммунных эффекторных клеток, таких как гемопоэтические стволовые клетки (HSC), входящие в популяцию CD34⁺ клеток, полученных из пуповинной крови, костного мозга или мобилизованных клеток периферической крови, которые после введения субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, или которые можно индуцировать *in vitro* к дифференциации в зрелые иммунные эффекторные клетки.

Используемые в данном документе иммунные эффекторные клетки, полученные методами генной инженерии для включения ВСМА-специфического CAR, можно

называть «ВСМА-специфические перенаправленные иммунные эффекторные клетки».

Используемый в данном документе термин «CD34+ клетка» относится к клетке, экспрессирующей на своей клеточной поверхности CD34-белок. Используемый в настоящем документе «CD34» относится к гликопротеину клеточной поверхности (например, белку сиаломуцину), который зачастую действует как фактор межклеточной адгезии и участвует в попадании Т-клеток в лимфатические узлы. Популяция CD34+ клеток состоит из гемопоэтических стволовых клеток (HSC), которые после введения пациенту дифференцируются и участвуют в образовании всех ростков кроветворения, в том числе Т-клеток, НК-клеток, НКТ-клеток, нейтрофилов и клеток моноцитарной/ макрофагальной клеточной линии.

В настоящем изобретении предусмотрены способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR, рассмотренный в данном документе. В одном варианте осуществления способ предусматривает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных из индивидуума, вследствие чего иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более CAR, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки выделяют из индивидуума и генетически модифицируют без дальнейших манипуляций *in vitro*. Такие клетки затем можно напрямую повторно вводить индивидууму. В дополнительных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сначала активируют и стимулируют к пролиферации *in vitro*, перед тем как подвергнуть генетической модификации для экспрессии CAR. В связи с этим, иммунные эффекторные клетки можно культивировать до и/или после того, как их подвергли генетической модификации (т. е. подвергли трансдукции или трансфекции для экспрессии CAR, рассмотренного в данном документе).

В конкретных вариантах осуществления до проведения *in vitro* манипуляций или генетической модификации иммунных эффекторных клеток, описанных в данном документе, источник клеток получают из субъекта. В конкретных вариантах осуществления CAR-модифицированные иммунные эффекторные клетки предусматривают Т-клетки. Т-клетки можно получать из различных источников, в том числе без ограничений мононуклеарных клеток периферической крови, костного мозга, ткани лимфатического узла, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из очага инфекции, асцитов, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно получать из дозы крови, собранной у субъекта с применением любой из целого ряда методик, известных специалисту в данной области, например, с помощью осаждения, например, разделения с помощью FICOLLTM. В одном варианте осуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные белые кровяные клетки, красные кровяные клетки и тромбоциты. В одном варианте осуществления клетки, собранные посредством афереза, можно промывать для удаления фракции плазмы и для помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующей обработки. Клетки можно промывать при помощи PBS или другого подходящего раствора, не содержащего кальций, магний и большинство, если не все прочие двухвалентные катионы. Как будет понятно рядовым специалистам в данной области, стадию промывки можно выполнять при помощи способов, известных специалистам в данной области, например, с помощью полуавтоматической проточной центрифуги. К примеру, с помощью Cobe 2991 Cell Processor, Baxter CytoMate и т. п. После промывки клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах или других солевых растворах,

содержащих или не содержащих буфер. В определенных вариантах осуществления нежелательные компоненты из образца после афереза можно удалять в культуральной среде для непосредственного ресуспендирования клеток.

В определенных вариантах осуществления Т-клетки выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) посредством лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, путем центрифугирования в градиенте PERCOLL™.

Специфические субпопуляции Т-клеток, экспрессирующие один или более следующих маркеров: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO, можно дополнительно выделять при помощи методик позитивной или негативной селекции. В одном варианте осуществления специфическую субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующих CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO, дополнительно выделяют при помощи методик позитивной или негативной селекции. Например, обогащение популяции Т-клеток посредством негативной селекции можно осуществлять при помощи комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, которые характерны для негативно селектируемых клеток. Один способ для применения в данном документе представляет собой сортировку клеток и/или селекцию посредством негативной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, при которых используют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на негативно селектируемых клетках. Например, для обогащения в отношении CD4⁺ клеток посредством негативной селекции смесь моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточную цитометрию и сортировку клеток можно также применять для выделения клеточных популяций, представляющих интерес, для применения в настоящем изобретении.

РВМС можно напрямую генетически модифицировать для экспрессии CAR при помощи способов, рассмотренных в данном документе. В определенных вариантах осуществления после выделения РВМС Т-лимфоциты дополнительно выделяют и в некоторых вариантах осуществления, как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты можно сортировать на субпопуляции наивных, клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо перед, либо после генетической модификации и/или размножения.

CD8⁺ клетки можно получать с применением стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ клетки дополнительно сортируют на наивные, центральные клетки памяти и эффекторные клетки посредством идентификации антигенов клеточной поверхности, которые ассоциированы с каждым из данных типов CD8⁺ клеток.

В определенных вариантах осуществления наивные CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров наивных Т-клеток, в том числе CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 и CD45RA.

В конкретных вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют в обеих субпопуляциях, CD62L⁺ и CD62L⁻, CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. РВМС сортируют на фракции CD62L⁻CD8⁺ и CD62L⁺CD8⁺ после окрашивания с помощью антител к CD8 и CD62L. В некоторых вариантах осуществления на центральных Т-клетках памяти экспрессируются фенотипические маркеры CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127, и они являются негативными по гранзиме В. В некоторых вариантах осуществления центральные Т-клетки памяти представляют собой CD45RO⁺, CD62L⁺,

CD8⁺ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки являются негативными по CD62L, CCR7, CD28 и CD127, и позитивными по гранзиме В и перфорины.

В определенных вариантах осуществления CD4⁺ Т-клетки дополнительно сортируют на субпопуляции. Например, CD4⁺ Т-хелперные клетки можно сортировать на наивные, центральные клетки памяти и эффекторные клетки посредством идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4⁺ лимфоциты можно получать с помощью стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления наивные CD4⁺ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ CD4⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления центральные CD4⁺ клетки памяти являются CD62L-позитивными и CD45RO-позитивными. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4⁺ клетки являются CD62L- и CD45RO-негативными.

Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, можно генетически модифицировать с последующим выделением с применением стандартных способов, или иммунные эффекторные клетки можно активировать и размножать (или дифференцировать в случае клеток-предшественников) *in vitro* перед тем, как проводить их генетическую модификацию. В конкретном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицируют с помощью химерных антигенных рецепторов, рассмотренных в данном документе (например, трансдуцируют с помощью вирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активируют и размножают *in vitro*. В различных вариантах осуществления Т-клетки можно активировать и размножать до или после генетической модификации для экспрессии CAR с помощью способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041 и в публикации заявки на патент США № 20060121005.

Как правило, Т-клетки размножают путем приведения в контакт с поверхностью, характеризующейся прикрепленным к ней средством, которое стимулирует сигнал, ассоциированный с CD3-TCR-комплексом, и лигандом, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. Популяции Т-клеток можно стимулировать путем приведения в контакт с антителом к CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с кальциевым ионофором. Костимуляция вспомогательных молекул на поверхности Т-клеток также рассматривается.

В конкретных вариантах осуществления РВМС или выделенные Т-клетки приводят в контакт со стимулирующим средством и костимулирующим средством, таким как антитела к CD3 и CD28, как правило, присоединенными к грануле или другой поверхности, в среде для культивирования с соответствующими цитокинами, такими как IL-2, IL-7 и/или IL-15. Для стимуляции пролиферации либо CD4⁺ Т-клеток, либо CD8⁺ Т-клеток применяют антитело к CD3 и антитело к CD28. Примеры антитела к CD28, в том числе 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diacione, Безансон, Франция), можно использовать, также как можно использовать другие традиционные способы из уровня техники (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190

(9): 13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1 -2):53-63, 1999). Антитело к CD3 и антитело к CD28, прикрепленные к одной грануле, выступают в роли «суррогатной» антигенпрезентирующей клетки (APC). В других вариантах осуществления Т-клетки можно активировать и стимулировать к пролиферации с помощью питающих клеток, а также соответствующих антител и цитокинов посредством таких способов, как описано в US6040177; US5827642 и WO2012129514.

В других вариантах осуществления искусственные APC (aAPC) получают путем конструирования клеток K562, U937, 721.221, T2 и C1R, предназначенных для стабильной экспрессии и секреции целого ряда костимулирующих молекул и цитокинов. В конкретном варианте осуществления применяют aAPC в виде K32 или U32, предназначенные для выставления одной или более стимулирующих молекул на основе антитела на клеточной поверхности AAPC. Экспрессия различных комбинаций генов на aAPC обеспечивает возможность точного определения требований для активации человеческих Т-клеток, так что aAPC можно адаптировать для оптимального размножения субпопуляций Т-клеток со специфическими требованиями в отношении ростовой среды и имеющих различные функции. aAPC поддерживают *ex vivo* рост и долгосрочное размножение функциональных человеческих CD8 Т-клеток без необходимости в добавлении экзогенных цитокинов, в отличие от применения природных APC. Популяции Т-клеток можно размножать при помощи aAPC, экспрессирующих различные костимулирующие молекулы, в том числе без ограничений CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) и/или CD80 или CD86. Наконец, aAPC обеспечивают эффективную платформу для размножения генетически модифицированных Т-клеток и для поддержания экспрессии CD28 на CD8 Т-клетках. aAPC, предусмотренные в WO 03/057171 и US2003/0147869, включены тем самым посредством ссылки во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления CD34⁺ клетки трансдуцируют с помощью конструкции нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. В определенных вариантах осуществления трансдуцированные CD34⁺ клетки дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки *in vivo* после введения субъекту, как правило, субъекту, из которого данные клетки были изначально выделены. В другом варианте осуществления CD34⁺ клетки можно стимулировать *in vitro* до воздействия или после того, как их подвергают генетической модификации с помощью CAR, как описано в данном документе, при помощи одного или более следующих цитокинов: лиганда Flt-3 (FLT3), фактора стволовых клеток (SCF), фактора роста и дифференцировки мегакариоцитов (TPO), IL-3 и IL-6 в соответствии со способами, описанными ранее (Asheuer et al., 2004; Imren, et al., 2004).

В настоящем изобретении предусмотрена популяция модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения рака, при этом модифицированные иммунные эффекторные клетки содержат CAR, раскрываемый в данном документе. Например, популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток получают из моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных от пациента с диагностированным В-клеточным злокачественным новообразованием, описанным в данном документе (аутологичные доноры). PBMC образуют гетерогенную популяцию Т-лимфоцитов, которые могут представлять собой CD4⁺, CD8⁺ или CD4⁺ и CD8⁺.

PBMC также могут включать другие цитотоксические лимфоциты, такие как NK-клетки или NKT-клетки. Вектор экспрессии, несущий кодирующую последовательность CAR, рассмотренного в данном документе, можно вводить в популяцию человеческих

донорных Т-клеток, НК-клеток или NKT-клеток. Успешно трансдуцированные Т-клетки, которые несут вектор экспрессии, можно отсортировать с применением проточной цитометрии для выделения CD3-позитивных Т-клеток, а затем дополнительно размножить для увеличения количества этих Т-клеток, экспрессирующих белок CAR, в дополнение к активации клеток с применением антител к CD3 и/или антител к CD28 и IL-2 или любых других способов, известных из уровня техники, описываемых в других частях данного документа. Стандартные процедуры применяют для криоконсервации Т-клеток, экспрессирующих белок CAR, для хранения Т-клеток и/или препарата для применения у субъекта-человека. В одном варианте осуществления *in vitro* трансдукцию, культивирование и/или размножение Т-клеток проводят в отсутствие продуктов животного происхождения, не являющихся человеческими, таких как фетальная телячья сыворотка и фетальная бычья сыворотка. Поскольку гетерогенная популяция РВМС является генетически модифицированной, полученные трансдуцированные клетки представляют собой гетерогенную популяцию модифицированных клеток, содержащих ВСМА-специфический нацеленный CAR, рассматриваемый в данном документе.

В дополнительном варианте осуществления при генетической модификации донорной популяции иммунных эффекторных клеток можно использовать смесь, например, одного, двух, трех, четырех, пяти или более, различных векторов экспрессии, где каждый вектор кодирует белок отдельного химерного антигенного рецептора, рассматриваемого в данном документе. Полученные модифицированные иммунные эффекторные клетки образуют смешанную популяцию модифицированных клеток, при этом определенная доля модифицированных клеток экспрессирует несколько различных белков CAR.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ хранения генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих белок мышинового, человеческого или гуманизированного CAR, который нацеливается на белок ВСМА, включающий криоконсервирование иммунных эффекторных клеток, так что клетки сохраняют жизнеспособность после оттаивания. Фракцию иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих белки CAR, можно криоконсервировать при помощи способов, известных из уровня техники, чтобы обеспечить постоянный источник таких клеток для будущего лечения пациентов, страдающих от состояния, связанного с В-клетками. При необходимости криоконсервированные трансформированные иммунные эффекторные клетки можно оттаивать, выращивать и размножать для увеличения количества таких клеток.

Используемая в данном документе «криоконсервация» относится к сохранению клеток путем охлаждения до температур ниже нуля, таких как (обычно) 77 К или -196°C (температура кипения жидкого азота). Чтобы предотвратить разрушение клеток, подлежащих сохранению, в процессе замораживания при низких температурах или в ходе нагревания до комнатной температуры, зачастую используют криопротекторные средства. Криопротекторные средства и оптимальные скорости охлаждения могут защитить клетки от повреждения. Криопротекторные средства, которые можно использовать, включают без ограничений диметилсульфоксид (DMSO) (Lovelock and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), глицерин, поливинилпирролидин (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576) и полиэтиленгликоль (Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет $1^{\circ}\text{C}/\text{минута}$. После по меньшей мере двух часов Т-клетки достигают температуры -80°C и их можно поместить напрямую в жидкий азот (-196°C) для постоянного хранения, например, в криогенный сосуд для долгосрочного хранения.

Н. Композиции и составы

Композиции, рассмотренные в данном документе, могут содержать один или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, их содержащих, генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток и т. д., рассматриваемых в данном документе. Композиции включают без ограничений фармацевтические композиции.

5 «Фармацевтической композицией» называют композицию, составленную в фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых растворах для введения в клетку или животному либо отдельно, либо в комбинации с одним или более иными видами терапии. Следует также иметь в виду, что, при желании, композиции по
10 настоящему изобретению можно также вводить в комбинации с другими средствами, такими как, например, цитокины, факторы роста, гормоны, малые молекулы, химиотерапевтические средства, пролекарства, лекарственные средства, антитела или другие различные фармацевтически активные средства. Для других компонентов, которые также можно включать в композиции, практически не существует ограничений, при условии, что такие дополнительные средства не оказывают отрицательного влияния
15 на способность композиции доставлять предусмотренное терапевтическое средство.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или готовых лекарственных форм, которые, в рамках медицинских показаний, пригодны для применения в контакте с тканями человека и животных, при этом не вызывают чрезмерной токсичности,
20 раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соизмеримых с приемлемым соотношением польза/риск.

Используемый в настоящем документе «фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель» включает без ограничений любой адъювант, носитель, наполнитель, скользящее средство, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/
25 окрашивающее средство, усилитель вкуса и запаха, поверхностно-активное вещество, смачивающее средство, диспергирующее средство, суспендирующее средство, стабилизатор, изотоническое средство, растворитель, поверхностно-активное вещество или эмульгатор, которые были одобрены Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США как пригодные для применения у человека
30 или домашних животных. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают без ограничений сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао, воски, животные и растительные жиры, парафины,
35 силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, окись цинка; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния
40 и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы и любые другие совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

В конкретных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат некоторое количество CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток,
45 рассмотренные в данном документе. Используемый в данном описании термин «количество» относится к «количеству, эффективному для» или «эффективному количеству» генетически модифицированной терапевтической клетки, например, Т-клетки, для достижения полезного или необходимого профилактического или

терапевтического результата, в том числе клинических результатов.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству генетически модифицированной терапевтической клетки, эффективному для достижения необходимого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, поскольку

5 профилактическую дозу применяют у субъектов до появления заболевания или на его ранней стадии, профилактически эффективное количество меньше терапевтически эффективного количества.

«Терапевтически эффективное количество» генетически модифицированной терапевтической клетки может меняться в зависимости от таких факторов, как стадия

10 заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также от способности стволовых и клеток-предшественников вызывать необходимый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором любые токсические или вредные эффекты вируса или трансдуцированных терапевтических клеток перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. Термин

15 «терапевтически эффективное количество» включает количество, которое является эффективным для «лечения» субъекта (например, пациента). Если указано терапевтическое количество, точное количество композиций по настоящему изобретению, которое следует ввести, может определить лечащий врач с учетом индивидуальных отличий в возрасте, весе, размере опухоли, степени инфекции или

20 метастазов и состоянии пациента (субъекта). В целом можно указать, что фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, описанные в данном документе, можно вводить в дозе 10^2 - 10^{10} клеток/кг массы тела, предпочтительно 10^5 - 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Количество

25 клеток будет зависеть от способа конечного применения, для которого предназначена данная композиция, а также от типа клеток, включенных в нее. Для способов применений, предусмотренных в данном документе, в целом количество клеток на литр объема или менее, может составлять 500 мл или менее, даже 250 мл или 100 мл или менее. Следовательно, плотность требуемых клеток, как правило, превышает 10^6 клеток/

30 мл и в целом превышает 10^7 клеток/мл, в целом составляет 10^8 клеток/мл или больше. Клинически значимое количество иммунных клеток можно распределить на несколько инфузий, которые совокупно равны или превышают 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} или 10^{12} клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения, в частности, если все

35 введенные клетки будут перенаправлены на конкретный целевой антиген, можно вводить сниженные количества клеток в диапазоне 10^6 /кг (10^6 - 10^{11} на пациента). Композиции на основе клеток, экспрессирующих CAR, можно вводить несколько раз при дозах в пределах указанных диапазонов. Клетки могут быть аллогенными, сингенными, ксеногенными или аутологичными относительно пациента, проходящего

40 лечение. При необходимости, для усиления индукции иммунного ответа лечение может также включать введение митогенов (например, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF-альфа, IL-18 и TNF-бета, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α и т.д.), описываемых в данном документе.

В целом, композиции, содержащие клетки, активированные и размноженные, как

45 описано в данном документе, можно использовать в лечении и предупреждении заболеваний, которые возникают у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. В частности, композиции, содержащие CAR-модифицированные Т-клетки, рассмотренные в данном документе, применяют в лечении В-клеточных злокачественных

новообразований. CAR-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с носителями, разбавителями, наполнителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции, рассмотренные в данном документе, содержат некоторое количество генетически модифицированных Т-клеток в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или наполнителями.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие популяцию CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки, могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, фосфатный буферный солевой раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно составлены для парентерального введения, например, внутрисосудистого (внутривенного или внутриартериального), внутривентрикулярного или внутримышечного введения.

Жидкие фармацевтические композиции, будь то растворы, суспензии или другие аналогичные формы, могут включать одно или более из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулах, одноразовых шприцах или флаконах с многократными дозами, изготовленных из стекла или пластика. Инъецируемая фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

В конкретном варианте осуществления композиции, рассмотренные в данном документе, содержат эффективное количество CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими средствами. Таким образом, композиции на основе CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток можно вводить отдельно или в комбинации с другими известными способами лечения рака, такими как лучевая терапия, химиотерапия, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т. д. Композиции также можно вводить в комбинации с антибиотиками. Такие терапевтические средства могут быть приняты в данной области техники в качестве стандартного лечения конкретного болезненного состояния, описываемого в данном документе, такого как конкретная форма рака. Примеры предусмотренных терапевтических средств включают цитокины, факторы роста, стероиды, NSAID, DMARD, противовоспалительные средства, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства, терапевтические антитела или другие активные и вспомогательные средства.

В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, раскрытые в данном документе,

можно вводить в сочетании с любым количеством химиотерапевтических средств.

Иллюстративные примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (СУТОХАН™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилентифосфорамида и триметилломеламиновую смолу; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин, эпирубин, эзорубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностафин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестостерон; средства, угнетающие функции коры надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; добавку для восполнения фолиевой кислоты, такую как фолиевая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптинума ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доксетаксел (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Антони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметиломитин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Targretin™ (бексаротен), Panretin™ (алитретиноин); ONTAK™ (денилейкин дифтитокс); эсперамицины; капецитабин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанного. Также в это определение включены антигормональные средства, которые регулируют или ингибируют действие гормонов в отношении форм рака, такие как антиэстрогены, включающие, например, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин;

а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанного.

Целый ряд других терапевтических средств можно использовать в сочетании с композициями, описанными в данном документе. В одном варианте осуществления композицию, содержащую CAR-экспрессирующие иммунные эффекторские клетки, вводят с противовоспалительным средством. Противовоспалительные средства или препараты включают без ограничений стероиды и глюкокортикоиды (в том числе бетаметазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные средства (NSAIDS), в том числе аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, лекарственные препараты против TNF, циклофосфамид и микофенолат.

Другие примеры NSAID выбраны из группы, включающей ибупрофен, напроксен, напроксен-натрий, ингибиторы Cox-2, такие как VIOXX® (рофекоксиб) и CELEBREX® (целекоксиб) и салилаты. Примеры обезболивающих средств выбраны из группы, включающей ацетаминофен, оксикодон, трамадол или пропоксифена гидрохлорид. Примеры глюкокортикоидов выбраны из группы, включающей кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или преднизон. Примеры модификаторов биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров клеточной поверхности (например, CD4, CD5 и т. д.), ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты TNF (например, этанерцепт (ENBREL®), адалимумаб (HUMIRA®) и инфликсимаб (REMICADE®)), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Примеры DMARD включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, препарат золота (пероральный (ауранофин) и внутримышечный) и миноциклин.

Иллюстративные примеры терапевтических антител, пригодных для комбинации с CAR-модифицированными Т-клетками, рассмотренными в данном документе, включают без ограничений бавитуксимаб, бевацизумаб (авастин), биватузумаб, блинатумомаб, конатумумаб, даратумумаб, дулиготумаб, дацетузумаб, далотузумаб, элотузумаб (HuLuc63), гемтузумаб, ибритумомаб, индатуксимаб, инотузумаб, лорвотузумаб, лукатумумаб, милатузумаб, моксетумомаб, окаратузумаб, офатумумаб, ритуксимаб, силтуксимаб, тепротумумаб и ублитуксимаб.

В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, вводят в сочетании с цитокином. Под используемым в данном документе «цитокином» подразумевают общий термин, обозначающий белки, высвобождаемые одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. В число цитокинов включены гормоны роста, такие как человеческий гормон роста, N-метионил человеческий гормон роста и гормон роста крупного рогатого скота; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреостимулирующий гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста гепатоцитов; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухолей-альфа и -бета; мюллерова ингибирующая субстанция; мышечный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбopoэтин (TPO); факторы

роста нервов, такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуцирующие факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный-CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный-CSF (GM-CSF) и гранулоцитарный-CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухолей, такой как TNF-альфа или TNF-бета; и другие полипептидные факторы, в том числе LIF и kit-лиганд (KL). Используемый в данном документе термин «цитокин» включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток, а также биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной последовательностью.

I. Способы терапии

Генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассмотренные в данном документе, обеспечивают улучшенные способы адоптивной иммунотерапии для применения в лечении состояний, связанных с В-клетками, которые включают без ограничений состояния, связанные с нарушением иммунорегуляции, и гемобластозы.

В конкретных вариантах осуществления специфичность первичной иммунной эффекторной клетки перенаправлена на В-клетки посредством генетической модификации первичной иммунной эффекторной клетки при помощи CAR, рассмотренного в данном документе. В различных вариантах осуществления вирусный вектор применяют для генетической модификации иммунной эффекторной клетки с помощью конкретного полинуклеотида, кодирующего CAR, содержащего гуманизированный антиген ВСМАсвязывающий домен, который связывает полипептид ВСМА; шарнирный домен; трансмембранный домен (ТМ), короткий олиго- или полипептидный линкер, который соединяет домен ТМ с внутриклеточным доменом передачи сигнала CAR; и один или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала; и домен передачи первичного сигнала.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен тип клеточной терапии, при которой Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии CAR, который нацеливается на В-клетки, экспрессирующие ВСМА, и CAR-Т-клетку вводят реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная клетка способна уничтожить В-клетки, вызывающие заболевание, в реципиенте. В отличие от терапии на основе антител CAR-Т-клетки способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к долгосрочной персистенции, которая может обеспечить длительную терапию рака.

В одном варианте осуществления CAR-Т-клетки по настоящему изобретению могут подвергаться активному *in vivo* размножению Т-клеток и могут персистировать в течение длительного периода времени. В другом варианте осуществления CAR-Т-клетки по настоящему изобретению превращаются в специфические Т-клетки памяти, которые могут реактивироваться для ингибирования любого дополнительного образования или роста опухоли.

В конкретных вариантах осуществления композиции, содержащие иммунные эффекторные клетки, которые содержат CAR, рассмотренные в данном документе, применяют для лечения состояний, связанных с аномальной активностью В-клеток.

Иллюстративные примеры состояний, которые можно лечить, предупреждать или ослаблять с помощью иммунных эффекторных клеток, содержащих CAR, рассмотренные в данном документе, включают без ограничений: системную красную волчанку, ревматоидный артрит, миастению гравис, аутоиммунную гемолитическую анемию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, антифосфолипидный синдром,

болезнь Чагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, нодозный полиартериит, синдром Шегрена, обыкновенную пузырчатку, склеродермию, рассеянный склероз, антифосфолипидный синдром, ANCA-ассоциированный васкулит, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки и быстро прогрессирующий гломерулонефрит.

5 Модифицированные иммунные эффекторные клетки также могут иметь применение при нарушениях, ассоциированных с плазмócитами, таких как болезнь тяжелых цепей, первичный или иммуноцит-ассоциированный амилоидоз и моноклональная гаммапатия неясного генеза (MGUS).

10 Используемый в данном документе термин «В-клеточное злокачественное новообразование» относится к типу рака, который образуется в В-клетках (тип клетки иммунной системы), как обсуждается ниже.

В конкретных вариантах осуществления композиции, содержащие CAR-модифицированные Т-клетки, рассмотренные в данном документе, применяют для лечения гемобластозов, в том числе без ограничений В-клеточных злокачественных новообразований, таких как, например, множественная миелома (ММ) и неходжкинская лимфома (NHL).

Множественная миелома представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование из морфологически зрелых плазмócитов, характеризующееся злокачественным перерождением одного клона этих типов клеток. Эти плазмócиты пролиферируют в ВМ и могут инвазировать в прилегающую кость и иногда кровь. 20 Вариантные формы множественной миеломы включают клинически выраженную множественную миелому, вялотекущую множественную миелому, плазмócитарный лейкоз, несекреторную миелому, IgD-миелому, остеосклеротическую миелому, солитарную плазмócитому кости и экстрамедуллярную плазмócитому (см., например, 25 Braunwald, et al. (eds), Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th Edition (McGraw-Hill 2001)).

Неходжкинская лимфома охватывает большую группу форм рака лимфоцитов (белых кровяных клеток). Неходжкинские лимфомы могут возникать в любом возрасте и зачастую характеризуются увеличенными размерами лимфатических узлов, лихорадкой 30 и потерей веса. Существует множество различных типов неходжкинской лимфомы. Например, неходжкинскую лимфому можно подразделять на агрессивные (быстрорастущие) и вялотекущие (медленнорастущие) типы. Несмотря на то, что неходжкинские лимфомы могут происходить из В-клеток и Т-клеток, используемые в данном документе термины «неходжкинская лимфома» и «В-клеточная неходжкинская 35 лимфома» используются взаимозаменяемо. В-клеточные неходжкинские лимфомы (NHL) включают лимфому Беркитта, хронический лимфолейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (CLL/SLL), диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, лимфобластную лимфому из В-клеток-предшественников и лимфому из клеток 40 мантийной зоны. Лимфомы, возникающие после трансплантации костного мозга или стволовых клеток, как правило, представляют собой В-клеточные неходжкинские лимфомы.

Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) представляет собой вялотекущий (медленнорастущий) рак, который вызывает медленное увеличение количества незрелых 45 белых кровяных клеток, называемых В-лимфоцитами или В-клетками. Раковые клетки распространяются в крови и костном мозге, а также могут поражать лимфатические узлы или другие органы, такие как печень и селезенка. Со временем CLL приводит к поражению костного мозга. Иногда, на более поздних стадиях заболевания, данное

заболевание называют мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома.

В конкретных вариантах осуществления предусмотрены способы, включающие введение терапевтически эффективного количества CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, рассмотренных в данном документе, или содержащей их композиции пациенту, нуждающемуся в этом, отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими средствами. В определенных вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению применяют для лечения пациентов с риском развития состояния, ассоциированного с аномальной активностью В-клеток, или В-клеточного злокачественного новообразования. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения или предупреждения состояния, ассоциированного с аномальной активностью В-клеток, или В-клеточного злокачественного новообразования, предусматривающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества CAR-модифицированных клеток, рассмотренных в данном документе.

Используемые в данном документе термины «индивидуум» и «субъект» зачастую используются взаимозаменяемо и относятся к любому животному, у которого обнаружен симптом заболевания, нарушения или состояния, которые можно лечить с помощью векторов для генной терапии, терапевтических средств на основе клеток и способов, раскрытых в других частях данного документа. В предпочтительных вариантах осуществления субъект включает любое животное, у которого проявляются симптомы заболевания, нарушения или состояния, связанных с системой кроветворения, например, В-клеточного злокачественного новообразования, которые можно лечить с помощью векторов для генной терапии, терапевтических средств на основе клеток и способов, раскрытых в других частях данного документа. Подходящие субъекты (например, пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или питомцев (таких как кошка или собака). Включены отличные от человека приматы и, предпочтительно, пациенты-люди. Типичными субъектами являются пациенты-люди, у которых имеется В-клеточное злокачественное новообразование, у которых было диагностировано В-клеточное злокачественное новообразование, или которые подвержены риску развития В-клеточного злокачественного новообразования.

Используемый в данном документе термин «пациент» относится к субъекту, у которого было диагностировано конкретное заболевание, нарушение или состояние, которое можно лечить с помощью векторов для генной терапии, терапевтических средств на основе клеток и способов, раскрытых в других частях данного документа.

Используемое в данном документе «лечение» или «осуществление лечения» включает любой положительный или необходимый эффект в отношении симптомов или патологических признаков заболевания или патологического состояния, и может включать даже небольшое снижение одного или более измеряемых маркеров заболевания или состояния, подлежащего лечению. Лечение может необязательно подразумевать либо уменьшение или ослабление симптомов заболевания или состояния, либо отсрочку прогрессирования заболевания или состояния. «Лечение» необязательно означает полное устранение или излечение заболевания или состояния, или связанных с ними симптомов.

Используемый в данном описании термин «предупреждать» и аналогичные слова, такие как «предупрежденный», «предупреждение» и т. д., обозначают подход для предупреждения, ингибирования или снижения вероятности возникновения или рецидива заболевания или состояния. Он также относится к отсрочке манифестации или рецидива

заболевания или состояния или к отсрочке появления или рецидива симптомов заболевания или состояния. Используемый в данном документе термин «предупреждение» и аналогичные слова также включают снижение интенсивности, эффекта, симптомов и/или бремени заболевания или состояния до манифестации или рецидива заболевания или состояния.

«Усиливать», или «содействовать», или «увеличивать», или «повышать» обычно относится к способности композиции, рассмотренной в данном документе, например, генетически модифицированной Т-клетки или вектора, кодирующего CAR, обеспечивать, способствовать или вызывать более сильную физиологическую реакцию (т. е. последующие эффекты) по сравнению с реакцией, вызванной либо носителем, либо контрольной молекулой/композицией. Измеряемая физиологическая реакция может включать повышение размножения, активации, персистенции Т-клеток и/или повышение их способности вызывать цитолиз раковых клеток, наряду с прочим, очевидным из понимания в уровне техники и описания в данном документе. «Повышенное» или «увеличенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество, и может включать повышение, которое в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные знаки между ними, превышающие 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) превышает реакцию, обеспечиваемую носителем или контрольной композицией.

«Уменьшать», или «понижать», или «облегчать», или «снижать», или «ослаблять» обычно относится к способности композиции, рассмотренной в данном документе, обеспечивать, способствовать или вызывать более слабую физиологическую реакцию (т. е. последующие эффекты) по сравнению с реакцией, вызванной либо носителем, либо контрольной молекулой/композицией. «Пониженное» или «уменьшенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество, и может включать уменьшение, которое в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные знаки между ними, превышающие 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) меньше по сравнению с реакцией (эталонной реакцией), обеспечиваемой носителем, контрольной композицией, или реакцией в конкретной клеточной линии.

«Поддерживать», или «сохранять», или «поддержание», или «без изменений», или «без существенных изменений», или «без существенного снижения» обычно относится к способности композиции, рассмотренной в данном документе, обеспечивать, способствовать или вызывать более слабую физиологическую реакцию (т. е. последующие эффекты) в клетке по сравнению с реакцией, обусловленной либо носителем, либо контрольной молекулой/композицией, или реакцией в конкретной клеточной линии. Соизмеримая реакция представляет собой реакцию, которая существенно не отличается или не отличается измеримо от эталонной реакции.

В одном варианте осуществления способ лечения состояния, связанного с В-клетками, у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение эффективного количества, например терапевтически эффективного количества, композиции, содержащей генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, рассмотренные в данном документе. Количество и частоту введения будут определять в зависимости от таких факторов, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания пациента, хотя соответствующие дозировки можно определить при помощи клинических испытаний.

В определенных вариантах осуществления может быть необходимо вводить субъекту активированные иммунные эффекторные клетки, а затем последовательно осуществлять

поворные заборы крови (или выполнять аферез), активировать полученные из нее иммунные эффекторные клетки в соответствии с настоящим изобретением, и осуществлять реинфузию этих активированных и размноженных иммунных эффекторных клеток пациенту. Этот процесс можно осуществлять несколько раз через каждые несколько недель. В определенных вариантах осуществления можно активировать иммунные эффекторные клетки из крови, взятой в количестве от 10 см³ до 400 см³. В определенных вариантах осуществления активируют иммунные эффекторные клетки из крови, взятой в количестве 20 см³, 30 см³, 40 см³, 50 см³, 60 см³, 70 см³, 80 см³, 90 см³, 100 см³, 150 см³, 200 см³, 250 см³, 300 см³, 350 см³ или 400 см³ или более. Не привязываясь к какой-либо теории, применение такого протокола множественных заборов крови/множественной реинфузии может служить для отбора определенных популяций иммунных эффекторных клеток.

Введение композиций, рассмотренных в данном документе, можно осуществлять любым удобным способом, в том числе путем аэрозольной ингаляции, инъекции, приема внутрь, переливания, имплантации или трансплантации. В предпочтительном варианте осуществления композиции вводят парентерально. Используемые в данном документе фразы «парентеральное введение» и «введенный парентерально» относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, которые обычно осуществляют путем инъекции и которые включают без ограничений внутрисосудистую, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интракапсульную, внутриглазничную, внутриопухолевую, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и внутригрудинную инъекцию и инфузию. В одном варианте осуществления композиции, рассмотренные в данном документе, вводят субъекту путем инъекции непосредственно в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

В одном варианте осуществления субъекту, нуждающемуся в этом, вводят эффективное количество композиции для усиления клеточного иммунного ответа на состояние, связанное с В-клетками, у субъекта. Иммунный ответ может включать клеточные иммунные ответы, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными приводить к цитолизу инфицированных клеток, регуляторными Т-клетками, а также реакции с хелперными Т-клетками. Также могут быть индуцированы гуморальные иммунные ответы, опосредованные в первую очередь хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки, что, тем самым, приводит к выработке антител. Можно использовать целый ряд методик для анализа типа иммунных ответов, индуцируемых композициями по настоящему изобретению, которые хорошо описаны в уровне техники; например, Current Protocols in Immunology, под ред. John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

В случае опосредованного Т-клетками цитолиза клеток связывание CAR-лиганда инициирует передачу сигнала с помощью CAR в Т-клетку, что приводит к активации целого ряда путей передачи сигнала в Т-клетке, индуцируя Т-клетку к выработке или высвобождению белков, способных индуцировать апоптоз целевой клетки посредством различных механизмов. Такие опосредованные Т-клетками механизмы включают (без ограничений) перенос внутриклеточных цитотоксических гранул из Т-клетки в целевую клетку, Т-клеточную секрецию противовоспалительных цитокинов, которые могут индуцировать цитолиз клеток непосредственно (или опосредованно путем рекрутинга

других киллерных эффекторных клеток), и усиление экспрессии лигандов рецепторов смерти (например, FasL) на поверхности Т-клеток, которые индуцируют апоптоз целевой клетки после связывания со своим когнатным рецептором смерти (например, Fas) на целевой клетке.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ лечения субъекта, у которого было диагностировано состояние, связанное с В-клетками, включающий извлечение иммунных эффекторных клеток из субъекта, у которого было диагностировано состояние, связанное с В-клетками, экспрессирующими ВСМА, генетическую модификацию указанных иммунных эффекторных клеток с применением вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, рассматриваемый в данном документе, с получением, тем самым, популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение модифицированных иммунных эффекторных клеток тому же субъекту. В предпочтительном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки предусматривают Т-клетки.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения также предусмотрены способы стимуляции иммуномодулирующего ответа, опосредованного иммунными эффекторными клетками, в отношении популяции целевых клеток у субъекта, включающие стадии введения субъекту популяции иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу CAR.

Способы введения композиций на основе клеток, описанных в данном документе, включают любой способ, который является эффективным либо для повторного введения *ex vivo* генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые непосредственно экспрессируют CAR по настоящему изобретению в субъекте, либо для повторного введения генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые после введения в субъекта дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие CAR. Один способ включает трансдукцию Т-клеток периферической крови *ex vivo* с применением конструкции нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением и возврат трансдуцированных клеток в субъекта.

Все публикации, патентные заявки и выданные патенты, цитируемые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация, патентная заявка или выданный патент были конкретно и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки.

Хотя вышеизложенное изобретение было довольно подробно описано в целях иллюстрации и обеспечения примера для ясности понимания, среднему специалисту в данной области будет очевидно в свете идей настоящего изобретения, что в него могут быть внесены определенные изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры предусмотрены только в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения. Специалисты в данной области без труда смогут выявить целый ряд второстепенных параметров, которые можно было бы изменить или модифицировать, чтобы получить по существу такие же результаты.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Конструирование CAR к ВСМА

Разрабатывали гуманизированные scFv-антитела к ВСМА, которые содержат CAR, содержащие MND-промотор, функционально связанный с scFv-антителом к ВСМА,

шарнирный и трансмембранный домен из CD8 α и домены костимуляции CD137, за которыми расположен внутриклеточный домен передачи сигнала из CD3 ζ -цепи. Фигура 1. CAR к ВСМА содержат последовательность сигнального пептида (SP) CD8 α для экспрессии на поверхности иммунных эффекторных клеток. Полинуклеотидные последовательности CAR к ВСМА изложены под SEQ ID NO: 30-44, 70 и 72; полипептидные последовательности CAR к ВСМА изложены под SEQ ID NO: 15-29, 71 и 73; и карты векторов показаны на фигуре 1. В таблицах 3-5 показаны обозначение, индивидуальный код в Genbank, название источника и библиографическая ссылка для различных нуклеотидных сегментов различных примеров лентивирусных векторов с CAR к ВСМА.

ТАБЛИЦА 3

Нуклеотиды	Обозначение	Индивидуальный код в GenBank	Название источника	Библиографическая ссылка
1-185	Остов плазмиды pUC19	№ доступа L09137.2 нт 1-185	pUC19	New England Biolabs
185-222	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо
223-800	CMV	Не применимо	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS и последовательности упаковки	№ доступа M19921.2 нт 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	Стартовый кодон (ATG) gag изменен на стоп-кодон (TAG)	Не применимо	Синтетический	Не применимо
1140-1240	Последовательность gag HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	Последовательность gag HIV-1 изменена на второй стоп-кодон	Не применимо	Синтетический	Не применимо

Нуклеотиды	Обозначение	Индивидуальный код в GenBank	Название источника	Библиографическая ссылка
1244-1595	Последовательность gag HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1596-1992	cPPT/CTS pol HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	HIV-1, область (RRE) env изолята HXB3	№ доступа M14100.1 нт 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
2518-2693	Последовательности env HIV-1 S/A	№ доступа M19921.2 нт 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694-2708	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо
2709-3096	MND	Не применимо	rSPA.mPro.MND	Challita <i>et al.</i> (1995) J.Virol. 69: 748-755
3097-3125	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо
3126-3188	Сигнальный пептид		Синтетический	Не применимо
3189-3926	scFv к BCMA	Не применимо	Синтетический	Не применимо
3927-3935	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо
3936-4142	Шарнир и ТМ CD8a	№ доступа NM_001768	Синтетический	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4143-4268	Домен передачи сигнала CD137 (4-1BB)	№ доступа NM_001561	Синтетический	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4269-4607	Домен передачи сигнала CD3- ζ	№ доступа NM_000734	Синтетический	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4608-4718	ppt и часть U3 HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4719-4835	Часть U3 (399 п.о. удалены) и R HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4836-4859	Синтетический полиА	Не применимо ²	Синтетический	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025
4860-4878	Линкер	Не применимо ¹	Синтетический	Не применимо ¹
4879-7351	Остов pUC19	№ доступа L09137.2 нт 2636-2686	pUC19	New England Biolabs (приложение)

ТАБЛИЦА 4

Нуклеотиды	Обозначение	Индивидуальный код в GenBank	Название источника	Библиографическая ссылка
1-185	Остов плазмиды pUC19	№ доступа L09137.2 нт 1-185	pUC19	New England Biolabs (приложение)
185-222	Линкер	Не применимо ¹	Синтетический	Не применимо ¹
223-800	CMV	Не применимо ²	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS и последовательности упаковки	№ доступа M19921.2 нт 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	Стартовый кодон (ATG) gag изменен на стоп-кодон (TAG)	Не применимо ¹	Синтетический	Не применимо ¹
1140-1240	Последовательность gag HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	Последовательность gag HIV-1 изменена на второй стоп-кодон	Не применимо ¹	Синтетический	Не применимо ¹
1244-1595	Последовательность gag HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1596-1992	cPPT/CTS pol HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	HIV-1, область (RRE) env изолята HXB3	№ доступа M14100.1 нт 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
2518-2693	Последовательности env HIV-1 S/A	№ доступа M19921.2 нт 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694-2708	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
2709-3096	MND	Не применимо ²	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita <i>et al.</i> (1995) J.Virol. 69: 748-755
3097-3125	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
3126-3188	Сигнальный пептид	№ доступа NM_001768	Сигнальный пептид CD8a	Не применимо ³
3189-3926	Гуманизированный scFv к BCMA10.2 (VL-линкер-VH)	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
3927-3935	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо

3936-4124	Шарнир и ТМ CTLA4	№ доступа NM_001037631	Белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA4)	Не применимо ¹
4125-4250	Домен передачи сигнала CD137 (4-1BB)	№ доступа NM_001561	Домен передачи сигнала CD137	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453- 64
4251-4589	Домен передачи сигнала CD3-ζ	№ доступа NM_000734	Домен передачи сигнала CD3-ζ	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453- 64
4590-4700	ppt и часть U3 HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4701-4817	Часть U3 (399 п.о. удалены) и R HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4818-4841	Синтетический полиА	Не применимо	Синтетический	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019- 1025
4842-4860	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
4861-7333	Остов pUC19	№ доступа L09137.2 нт 2636-2686	pUC19	New England Biolabs (приложение)

ТАБЛИЦА 5

Нуклеотиды	Обозначение	Индивидуальный код в GenBank	Название источника	Библиографическая ссылка
1-185	Остов плазмиды pUC19	№ доступа L09137.2 нт 1-185	pUC19	New England Biolabs (приложение)
185-222	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
223-800	CMV	Не применимо	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564- 68
801-1136	R, U5, PBS и последовательности упаковки	№ доступа M19921.2 нт 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	Стартовый кодон (ATG) gag изменен на стоп- кодон (TAG)	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
1140-1240	Последовательность gag HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	Последовательность gag HIV-1 изменена на второй стоп-кодон	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹

1244-1595	Последовательность gag HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1596-1992	cPPT/CTS pol HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	HIV-1, область (RRE) env изолята HXB3	№ доступа M14100.1 нт 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
2518-2693	Последовательности env HIV-1 S/A	№ доступа M19921.2 нт 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694-2708	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
2709-3096	MND	Не применимо	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita <i>et al.</i> (1995) J.Virol. 69: 748-755
3097-3125	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
3126-3188	Сигнальный пептид	№ доступа NM_001768	Сигнальный пептид CD8a	Не применимо ³
3189-3926	Гуманизированный scFv к BCMA10.5 (VL-линкер-VH)	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
3927-3935	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо
3936-4118	Шарнир и TM PD-1	№ доступа NM_005018	Ген запрограммированной гибели клетки 1 (PDCD1)	Не применимо ¹
4119-4244	Домен передачи сигнала CD137 (4-1BB)	№ доступа NM_001561	Домен передачи сигнала CD137	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4245-4583	Домен передачи сигнала CD3-ζ	№ доступа NM_000734	Домен передачи сигнала CD3-ζ	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4584-4694	ppt и часть U3 HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4695-4811	Часть U3 (399 п.о. удалены) и R HIV-1	№ доступа M19921.2 нт 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4818-4841	Синтетический полиА	Не применимо	Синтетический	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025
4836-4854	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо ¹
4855-7327	Остов pUC19	№ доступа L09137.2 нт 2636-2686	pUC19	New England Biolabs (приложение)

Пример 2

Высокопроизводительный скрининг гуманизированных CAR к BCMA

Для быстрого скрининга CAR к BCMA был разработан анализ в микрокультуре. С помощью анализа в микрокультуре можно сравнивать 15-20 CAR-модифицированных Т-клеток (CAR-Т-клетки). Для иницирования роста Т-клеток мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) культивировали на 24-луночных планшетах в среде, содержащей IL-2 (CellGenix) и антитела, специфические в отношении CD3 и CD28 (Miltenyi Biotec). После 7 дней культивирования >99% размноженных Т-клеток представляли собой CD3-позитивные Т-клетки.

Т-клетки, размноженные из PBMC, модифицировали с помощью лентивирусов для экспрессии CAR к BCMA. Супернатанты от клеток, в которых продуцируются лентивирусы, полученные в результате транзientной трансфекции, добавляли к культуре PBMC в соотношении 1:1 (объем:объем) через один день после иницирования культуры.

По мере надобности культуры разделяли с применением свежей среды, содержащей IL-2, после того как они достигали конfluence, визуально различимой с применением инвертированного светового микроскопа. Через 12 дней культивирования CAR-T-клетки собирали и оценивали в отношении экспрессии и функционирования CAR.

Экспрессию CAR на поверхности Т-клеток анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием антитела, реактивного в отношении части CAR, представляющей собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (козье антитело к IgG мыши (GAM), Life Technologies). Среднее значение экспрессии каждого из 15 CAR в клетках от трех отдельных нормальных доноров показано в таблице 6. Экспрессия CAR была сравнимой, при этом количество CAR-позитивных Т-клеток варьировало от 47% до 63%. Тестировали эффективность трансдукции (обозначена как VCN в таблице 6) для различных конструкций CAR. VCN анализировали с помощью ПЦР с применением праймеров для амплификации интегрированного вируса.

ТАБЛИЦА 6

Конструкция	Процент изменения последовательности	Среднее значение экспрессии CAR	Среднее значение VCN
anti-BCMA-20	19,6	47,0	5,7
anti-BCMA-10	19,15	49,1	6,6
anti-BCMA-21	18,5	55,4	6,1
anti-BCMA-30	18,25	48,5	6,3
anti-BCMA-11	18,05	50,1	5,6
anti-BCMA-22	17,25	57,6	6,7
anti-BCMA-31	17,15	55,0	5,6
anti-BCMA-12	16,8	53,8	5,5
anti-BCMA-23	16,4	62,3	6,1
anti-BCMA-24	15,95	56,1	6,6
anti-BCMA-13	15,95	54,0	5,7
anti-BCMA-32	15,9	59,0	7,8
anti-BCMA-14	15,5	52,9	6,8
anti-BCMA-33	15,05	59,2	6,2
anti-BCMA-34	14,6	56,0	6,2

Пример 3

Антигенспецифическая реактивность CAR-T-клеток

Антигенспецифическую реактивность оценивали после совместного культивирования с BCMA-позитивными клеточными линиями. Т-клетки с CAR к BCMA совместно культивировали с клетками K562, сконструированными для экспрессии BCMA (K562-BCMA), в течение 24 часов. Реактивность Т-клеток с CAR к BCMA в отношении K562-BCMA анализировали по высвобождению IFN-гамма (IFN γ) в супернатант с помощью ELISA. Все исследуемые Т-клетки с гуманизированными CAR к BCMA высвобождали аналогичные количества IFN γ , и количества были сравнимыми с исходным мышинным CAR к BCMA. Фигура 2. В отличие от этого IFN γ не обнаруживали в культурах, содержащих либо нетрансдуцированные, либо Т-клетки с CD19-специфическим CAR, что доказывает, что BCMA-специфичность CAR-T-клеток была необходимой для реактивности в отношении клеток K562-BCMA.

В другой серии экспериментов оценивали цитолитическую активность в отношении

опухолей у Т-клеток, экспрессирующих один из пяти гуманизированных CAR к ВСМА. Т-клетки с CAR к ВСМА совместно культивировали с клетками K562-ВСМА в течение четырех часов. Эти пять линий Т-клеток с гуманизированным CAR к ВСМА демонстрировали аналогичную цитолитическую активность в отношении K562-ВСМА при всех трех соотношениях Т-клетки:опухолевые клетки. Фигура 3. Неожиданно обнаружено, что все исследуемые Т-клетки с гуманизированным CAR к ВСМА проявляли большую цитолитическую активность, чем Т-клетка с исходным мышинным CAR к ВСМА.

Пример 4

Фенотип и функция Т-клеток с гуманизированным CAR к ВСМА

Фенотип и функцию трех конструкций с гуманизированными молекулами к ВСМА (anti-BCMA-10, anti-BCMA-11, anti-BCMA-31) оценивали в системе культивирования, которую можно напрямую масштабировать до крупных производственных процессов, соответствующих клиническим требованиям. Вкратце, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) культивировали во флаконах для стационарного культивирования в среде, содержащей IL-2 (CellGenix) и антитела, специфические в отношении CD3 и CD28 (Miltenyi Biotec). 2×10^8 единиц трансдукции лентивируса, кодирующего CAR к ВСМА, добавляли через один день после инициирования культуры. Т-клетки с CAR к ВСМА поддерживали в фазе логарифмического роста путем добавления свежей среды, содержащей IL-2, в течение в общей сложности десяти дней культивирования. Размножали Т-клетки, полученные от трех нормальных доноров (800290, 800309, 801269), при этом клетки трансдуцировали с помощью мышинного CAR к ВСМА (BCMA-02), трех гуманизированных CAR к ВСМА или CAR к CD19 с отсутствием способности передачи сигнала (CAR19Δ). Т-клетки с CAR оценивали в отношении экспрессии CAR и реактивности в отношении антигена и опухолевой клетки в конце культивирования.

Экспрессию CAR к ВСМА на поверхности Т-клеток анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием антитела, реактивного в отношении части CAR, представляющей собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (козье антитело к IgG мыши (GAM), Life Technologies). Фигура 4. Наблюдали сравнимую экспрессию CAR в случае как мышинной (msBCMA-02), так и гуманизированных последовательностей (anti-BCMA-10, anti-BCMA-11, anti-BCMA-31). У всех трех доноров не наблюдалось существенных отличий в экспрессии мышинного или гуманизированного CAR к ВСМА (таблица 7).

ТАБЛИЦА 7

	Экспрессия CAR (GaM)					
	UnTD	CAR19Δ	BCMA-02	BCMA-10	BCMA-11	BCMA-31
800290	2,22	19,1	60,9	85,2	64,0	68,4
800309	2,37	13,9	56,6	77,9	54,4	57,9
801269	2,16	19,1	52,2	64,1	57,2	57,6
Среднее значение (±SE)	2,25 (±0,1)	17,4 (±1,7)	56,6 (±2,5)	75,7 (±6,2)	58,5 (±2,8)	61,3 (±3,6)

Среди Т-клеток с CAR к ВСМА не наблюдали существенных отличий в эффективности трансдукции. Число копий вектора (VCN), оцененное с помощью ПЦР с применением

праймеров для амплификации интегрированного вируса, было сравнимым для всех Т-клеток с CAR к ВСМА (таблица 8).

ТАБЛИЦА 8

	Число копий вектора (VCN)					
	UnTD	CAR19D	BCMA-02	BCMA-10	BCMA-11	BCMA-31
800290	0	1,4	4,3	3,9	3,1	3,6
800309	0	1,1	3,9	3,1	2,3	2,8
801269	0	1,1	3,9	2,6	2,5	2,7
Среднее значение ($\pm$ SE)	0	1,2 ($\pm$ 0,2)	4,0 ($\pm$ 0,2)	3,2 ($\pm$ 0,7)	2,6 ($\pm$ 0,4)	3,0 ($\pm$ 0,5)

Оценивали реактивность Т-клеток с CAR к ВСМА в отношении ВСМА-позитивных клеточных линий и опухолей. Наблюдали сравнимое высвобождение IFN γ после совместного культивирования Т-клеток с CAR к ВСМА с клетками K562-BCMA (экспрессирующими ВСМА на низком или высоком уровне) или клеточными линиями множественной миеломы (RPMI-8226, NCI-H929), но не с ВСМА-негативными клеточными линиями (HDLM-2, K562). Фигура 5.

Оценивали цитолитическую активность Т-клеток, экспрессирующих CAR к ВСМА. Т-клетки с CAR к ВСМА совместно культивировали с клетками K562-BCMA в течение четырех часов. Все исследуемые Т-клетки с CAR к ВСМА обуславливали сравнимую цитотоксичность в отношении клеток K562-BCMA. Фигура 6.

Пример 5

Тоническое высвобождение цитокинов у Т-клеток с гуманизированным CAR к ВСМА В конкретных вариантах осуществления клетки с молекулами CAR к ВСМА могут высвобождать цитокины при отсутствии стимуляции. Такое антигеннезависимое («тоническое») высвобождение цитокинов может наблюдаться после *in vitro* культивирования в условиях отсутствия антигена для таких рецепторов.

Наблюдали тоническое высвобождение цитокинов из Т-клеток, сконструированных для экспрессии гуманизированного CAR, anti-BCMA-10. Гуманизированную молекулу, anti-BCMA10, получали из мышиной молекулы, anti-BCMA-02, для снижения потенциальной иммуногенности, которая могла бы вызвать иммунные реакции в отношении мышиных последовательностей. Последовательности молекул CAR anti-BCMA-02 и anti-BCMA-10 суммарно отличаются менее, чем на 20%. Несмотря на эти изменения отличий в экспрессии CAR или реактивности в отношении антигенов ВСМА между мышиной молекулой, anti-BCMA-02, и гуманизированной молекулой, anti-BCMA-10, не наблюдали (фигура 5 и таблица 7). При этом в отсутствие ВСМА Т-клетки с гуманизированным CAR, anti-BCMA-10, высвобождали существенно большее количество провоспалительных цитокинов. Фигура 7.

Т-клетки с мышиным CAR, anti-BCMA-02, или гуманизированным CAR, anti-BCMA-10, культивировали в течение ночи на среде, содержащей человеческую сыворотку, но в отсутствие ВСМА. Уровни 12 цитокинов, высвобождаемых в супернатант, определяли с помощью мультиплексного анализа на микрогранулах (Luminex assay). 5×10^4 Т-клеток с гуманизированным CAR, anti-BCMA-10, высвобождали до 5 нг/мл провоспалительных цитокинов, в том числе MIP1 α , MIP1 β , IFN γ , GMCSF, IL-8 и TNF α . Такое же количество Т-клеток с мышиной молекулой CAR, anti-BCMA-02, высвобождали меньше 200 пг/мл. Ни одна из модификаций CAR не оказывала влияния на высвобождение

противовоспалительных цитокинов, в том числе IL-10 и IL-4.

Тоническое высвобождение цитокинов вызвало беспокойство в связи с известной токсичностью, вызываемой избыточным высвобождением цитокинов у пациентов, которых лечили с помощью Т-клеток с CAR к CD19. Повышенное антигеннезависимое
 5 тоническое высвобождение цитокинов, наблюдаемое у Т-клеток с гуманизированным CAR, anti-BCMA-10, могло бы обуславливать токсические уровни цитокинов у пациентов даже при отсутствии антигена BCMA. Изменения последовательности, осуществленные в мышинной молекуле, anti-BCMA-02, при получении гуманизированной молекулы, anti-BCMA-10, могли придать возникшую реактивность в отношении белков в человеческой
 10 сыворотке, не наблюдаемую в случае Т-клеток с мышинной молекулой, anti-BCMA-02. Реактивность в отношении белков человеческой сыворотки могла бы объяснить «тоническое» высвобождение цитокинов, наблюдаемое в случае гуманизированной молекулы, anti-BCMA-10.

Т-клетки с мышинным CAR, anti-BCMA-02, и гуманизированным CAR, anti-BCMA-10,
 15 оставляли на 48 часов в среде, содержащей фетальную телячью сыворотку вместо человеческой сыворотки. Т-клетки с CAR переносили на среду, содержащую человеческую сыворотку, и количество высвобожденного IFN γ сравнивали со значением для культур, поддерживаемых на среде с фетальной телячьей сывороткой. Среда для культивирования не оказывала влияния на высвобождение IFN- γ из каких-либо Т-клеток
 20 с CAR. Присутствие IFN γ не было обнаружено в конце культивирования Т-клеток с мышинным CAR, anti-BCMA-02, в то время как культуры с гуманизированным CAR, anti-BCMA10, содержали приблизительно 4 нг/мл IFN γ , независимо от среды для культивирования (фигура 8). Отсутствие реактивности у Т-клеток с мышинной молекулой CAR, anti-BCMA-02, не было связано с дисфункцией Т-клеток: оба типа Т-клеток с CAR
 25 к BCMA реагировали с иммобилизованным на планшете BCMA (данные не приведены).

Пример 6

Регуляция высвобождения цитокинов у Т-клеток с гуманизированной молекулой CAR к BCMA

CAR, содержащие мышинные последовательности, потенциально способны вызывать
 30 нежелательные иммунные ответы. Отдельные случаи в клинических испытаниях CAR позволили предполагать, что такие иммунные ответы способны ограничивать эффективность Т-клеток с CAR у некоторых пациентов. Гуманизация мышинных последовательностей представляет собой стратегию для снижения иммунных ответов в отношении мышинных последовательностей. При этом гуманизированный CAR, anti-BCMA-10, вызывал тоническое высвобождение провоспалительных цитокинов. Домен
 35 распознавания антигена у Т-клеток с молекулой CAR, anti-BCMA-10, связан с поверхностью Т-клетки с помощью трансмембранного домена CD8 α . Исследовали особенности трансмембранного домена и его влияние на димеризацию молекул CAR и последующую активацию в отсутствие антигена.

Конструировали молекулы CAR, anti-BCMA-10, с замещением трансмембранного домена CD8 α на трансмембранный домен либо CTLA-4 (anti-BCMA-10.2), либо PD-1 (anti-BCMA-10.5) (фигура 9). Экспрессию молекул anti-BCMA-10.2 и anti-BCMA-10.5 сравнивали с anti-BCMA-10 посредством окрашивания с помощью рекомбинантного белка человеческого BCMA, конъюгированного с IgG1 Fc-PE, и анализировали с
 45 помощью проточной цитометрии. На таблице 9 показаны результаты для Т-клеток, полученных от двух типичных нормальных доноров, при этом в клетках наблюдали надежную поверхностную экспрессию всех трех молекул CAR.

ТАБЛИЦА 9

Конструкция	Донор 1	Донор 2
anti-BCMA-10	90,4	87,7
anti-BCMA-10.2	86,2	86,7
anti-BCMA-10.5	76,2	78,0

Оценивали реактивность Т-клеток с CAR к BCMA в отношении BCMA-позитивных клеточных линий K562. Наблюдали сравнимое высвобождение IFN γ после совместного культивирования клеток с anti-BCMA-10, anti-BCMA-10.2 или anti-BCMA-10.5 с клетками K562-BCMA (фигура 10). Эти данные показывают, что замена трансмембранного домена на последовательности из либо CTLA-4, либо PD-1 не оказывало влияния на реактивность Т-клеток с молекулой CAR, anti-BCMA-10.

Тоническое высвобождение цитокинов оценивали посредством измерения IFN γ в супернатантах ночных культур клеток с мышинной молекулой, anti-BCMA-02, или гуманизированными молекулами, anti-BCMA-10, anti-BCMA-10.2 или anti-BCMA-10.5. Культуры клеток с anti-BCMA-02 содержали низкие количества IFN γ , как наблюдалось ранее. Супернатанты от культур клеток с anti-BCMA-10 содержали более высокие количества IFN γ . Культуры клеток с anti-BCMA-10.2 и anti-BCMA-10.5 содержали уровни IFN γ сравнимые с таковыми у клеток с anti-BCMA-02 и более низкие уровни, чем у Т-клеток с молекулой CAR, anti-BCMA-10 (фигура 11). Эти данные позволяют предположить, что замена трансмембранного домена может снижать тоническое высвобождение цитокинов без негативного воздействия на реактивность в отношении антигена у Т-клеток с CAR.

В целом в нижеследующей формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в настоящем описании и формуле изобретения, но должны быть истолкованы как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, которые такая формула изобретения охватывает. Соответственно, формула изобретения не ограничивается настоящим раскрытием.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> БЛУБЕРД БИО, Инк.
Морган Ричард
Фридман Кевин
- <120> ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К ВСМА
- <130> BLBD-037/03WO
- <150> US 62/028664
- <151> 2014-07-24
- <150> US 62/044103
- <151> 2014-08-29
- <150> US 62/152575
- <151> 2015-04-24
- <160> 73
- <170> PatentIn версия 3.5
- <210> 1

<211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.
 <400> 1
 5 Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 10 <213> Mus sp.
 <400> 2
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5
 <210> 3
 15 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.
 <400> 3
 Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr
 20 1 5
 <210> 4
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.
 25 <400> 4
 Asp Tyr Ser Ile Asn
 1 5
 <210> 5
 <211> 17
 30 <212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.
 <400> 5
 Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg
 1 5 10 15
 35 Gly
 <210> 6
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.
 40 <400> 6
 Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5
 <210> 7
 <211> 111
 45 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Легкая цепь гуманизированного антитела к ВСМА

<400> 7

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val Ile
 5 20 25 30
 Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 10 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
 Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 15 100 105 110

<210> 8

<211> 111

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь гуманизированного антитела к ВСМА

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 25 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val Ile
 20 25 30
 Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 30 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Ser Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
 35 Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 9

<211> 111

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь гуманизированного антитела к ВСМА

<400> 9

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 45 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val Ile
 20 25 30
 Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 5 65 70 75 80
 Arg Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Ser Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
 Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 10 <210> 10
 <211> 117
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Тяжелая цепь гуманизированного антитела к ВСМА
 <400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
 50 55 60
 25 Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 30 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 11
 <211> 117
 35 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Тяжелая цепь гуманизированного антитела к ВСМА
 <400> 11
 40 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
 50 55 60
 45 Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

RU 2 747 457 C2

	65					70					75					80
	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
5	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115													
	<210>	12														
	<211>	117														
10	<212>	БЕЛОК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	Тяжелая цепь гуманизированного антитела к ВСМА														
	<400>	12														
15	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
				20					25					30		
	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
20			35					40					45			
	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe
		50					55					60				
	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
25	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
					85					90					95	
	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
30			115													
	<210>	13														
	<211>	117														
	<212>	БЕЛОК														
	<213>	Искусственная последовательность														
35	<220>															
	<223>	Тяжелая цепь гуманизированного антитела к ВСМА														
	<400>	13														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
40	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20						25					30		
	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
			35					40					45			
	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe
45		50					55					60				
	Arg</															

		85		90		95										
	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
		100						105						110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
5		115														
	<210>	14														
	<211>	117														
	<212>	БЕЛОК														
	<213>	Искусственная последовательность														
10	<220>															
	<223>	Тяжелая цепь гуманизированного антитела к BCMA														
	<400>	14														
	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
15	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
		20						25						30		
	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
		35						40					45			
	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe
20		50						55					60			
	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70				75					80	
	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
					85					90				95		
25	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
		100							105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
		115														
	<210>	15														
30	<211>	493														
	<212>	БЕЛОК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	Гуманизированный CAR anti-BCMA-10														
35	<400>	15														
	Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
	1				5					10					15	
	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu
		20							25					30		
40	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu
		35						40					45			
	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Gly	Ala	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
		50						55				60				
	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu
45	65					70				75					80	
	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
					85					90				95		
	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ile	Tyr	Tyr

RU 2747457 C2

		100		105		110										
	Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
		115						120					125			
5	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
		130						135					140			
	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu
	145					150					155					160
	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
					165					170						175
10	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
					180					185				190		
	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
					195				200					205		
15	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr
		210						215						220		
	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp
	225						230					235				240
	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
					245					250						255
20	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr
					260					265					270	
	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln
					275					280				285		
25	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala
		290						295						300		
	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala
	305					310					315					320
	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr
					325						330					335
30	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln
					340					345					350	
	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser
					355					360				365		
35	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys
		370						375					380			
	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln
	385					390					395					400
	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu
					405					410						415
40	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg
					420					425					430	
	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met
					435					440				445		
45	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly
		450						455								460
	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp
	465					470					475					480
	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg			

	485	490
	<210> 16	
	<211> 493	
	<212> БЕЛЮК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-11	
	<400> 16	
10	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
	1 5 10 15	
	His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu	
	20 25 30	
	Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu	
	35 40 45	
15	Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys	
	50 55 60	
	Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu	
	65 70 75 80	
	Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
20	85 90 95	
	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr	
	100 105 110	
	Cys Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys	
	115 120 125	
25	Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly	
	130 135 140	
	Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu	
	145 150 155 160	
	Leu Lys Lys Pro Gly Glu Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly	
30	165 170 175	
	Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly	
	180 185 190	
	Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro	
	195 200 205	
35	Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr	
	210 215 220	
	Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp	
	225 230 235 240	
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr	
40	245 250 255	
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr	
	260 265 270	
	Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln	
	275 280 285	
45	Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala	
	290 295 300	
	Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala	
	305 310 315 320	

RU 2747457 C2

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
325 330 335
Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
340 345 350
5 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
355 360 365
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
370 375 380
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
10 385 390 395 400
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
405 410 415
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
420 425 430
15 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
435 440 445
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
450 455 460
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
20 465 470 475 480
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490
<210> 17
<211> 493
25 <212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-12
<400> 17
30 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
20 25 30
Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu
35 35 40 45
Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80
40 Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
45 115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu

RU 2747457 C2

	145		150		155		160									
	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
				165					170					175		
	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
5				180					185					190		
	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
				195					200					205		
	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr
				210					215					220		
10	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp
	225								230					235		240
	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
					245					250					255	
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr
15				260					265					270		
	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln
				275					280					285		
	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala
				290					295					300		
20	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala
	305					310					315					320
	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr
					325						330				335	
	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln
25				340					345					350		
	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser
				355					360					365		
	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys
				370				375				380				
30	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln
	385					390					395					400
	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu
				405					410					415		
	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg
35				420					425					430		
	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met
				435					440					445		
	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly
				450				455				460				
40	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp
	465					470					475					480
	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg			
				485					490							
	<210>	18														
45	<211>	493														
	<212>	БЕЛОК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															

<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-13

<400> 18

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

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
370 375 380
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
385 390 395 400
5 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
405 410 415
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
420 425 430
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
10 435 440 445
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
450 455 460
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
465 470 475 480
15 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490
<210> 19
<211> 493
<212> БЕЛОК
20 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-14
<400> 19
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
25 1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
20 25 30
Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
30 Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
35 85 90 95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr
100 105 110
Cys Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125
40 Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu
145 150 155 160
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
45 165 170 175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
180 185 190
Gln Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro

RU 2747457 C2

	195		200		205
	Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr				
	210		215		220
5	Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp				
	225		230		235
	Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr				
		245		250	255
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr				
		260		265	270
10	Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln				
		275		280	285
	Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala				
		290		295	300
15	Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala				
	305		310		315
	Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr				
		325		330	335
	Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln				
		340		345	350
20	Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser				
		355		360	365
	Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys				
		370		375	380
25	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln				
	385		390		395
	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu				
		405		410	415
	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg				
		420		425	430
30	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met				
		435		440	445
	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly				
		450		455	460
35	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp				
	465		470		475
	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg				
		485		490	
	<210> 20				
	<211> 493				
40	<212> БЕЛОК				
	<213> Искусственная последовательность				
	<220>				
	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-20				
	<400> 20				
45	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu				
	1	5	10	15	
	His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu				
		20	25	30	

RU 2747457 C2

	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu
		35						40					45			
	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Gly	Ala	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
		50					55					60				
5	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu
	65					70				75					80	
	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
					85				90					95		
	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ile	Tyr	Ser
10				100					105					110		
	Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
		115						120					125			
	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
	130						135					140				
15	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu
	145					150				155						160
	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
				165					170					175		
	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
20				180					185				190			
	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
		195						200					205			
	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr
	210					215				220						
25	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp
	225					230				235						240
	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
				245					250					255		
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr
30				260					265					270		
	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln
		275						280					285			
	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala
	290					295						300				
35	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala
	305					310				315						320
	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr
				325					330					335		
	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln
40				340					345					350		
	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser
		355						360					365			
	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys
	370					375						380				
45	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln
	385					390				395						400
	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu
				405					410					415		

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 420 425 430
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 435 440 445
 5 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 450 455 460
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 465 470 475 480
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 10 485 490
 <210> 21
 <211> 493
 <212> БЕЛЮК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-21
 <400> 21
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 20 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
 20 25 30
 Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu
 35 40 45
 Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
 25 50 55 60
 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
 65 70 75 80
 Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 30 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Ser
 100 105 110
 Cys Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
 35 130 135 140
 Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Lys Pro Gly Glu Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 165 170 175
 40 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
 195 200 205
 Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr
 45 210 215 220
 Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp
 225 230 235 240
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

				245					250					255			
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	
				260					265					270			
	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	
5			275					280					285				
	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	
			290				295					300					
	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	
	305					310					315					320	
10	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	
				325					330					335			
	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	
			340						345				350				
	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	
15			355				360						365				
	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	
			370				375					380					
	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	
	385					390					395					400	
20	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	
				405					410					415			
	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	
			420						425				430				
	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	
25			435				440						445				
	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	
			450				455					460					
	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	
	465					470					475					480	
30	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg				
				485						490							
	<210>	22															
	<211>	493															
	<212>	БЕЛОК															
35	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
	<223>	Гуманизированный CAR anti-BCMA-22															
	<400>	22															
	Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	
40	1			5					10					15			
	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	
			20						25					30			
	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	
			35						40					45			
45	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Gly	Ala	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	
		50					55					60					
	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	
	65					70					75					80	

RU 2747457 C2

	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
					85					90					95		
	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ile	Tyr	Ser	
				100					105					110			
5	Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	
			115					120					125				
	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	
		130					135					140					
	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	
10	145					150					155					160	
	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	
				165						170					175		
	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	
				180					185					190			
15	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro	
			195				200						205				
	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	
		210					215					220					
	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	
20	225					230					235					240	
	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	
				245						250					255		
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	
				260					265					270			
25	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	
			275					280					285				
	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	
		290				295						300					
	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	
30	305					310					315					320	
	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	
				325						330					335		
	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	
				340				345						350			
35	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	
			355					360					365				
	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	
		370				375						380					
	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	
40	385					390					395					400	
	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	
				405					410					415			
	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	
				420					425					430			
45	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	
			435					440					445				
	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	
		450					455					460					

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 465 470 475 480
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

5 <210> 23
 <211> 493
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

10 <223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-23
 <400> 23

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

	290		295		300	
	Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala					
	305		310		315	320
	Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr					
5		325		330		335
	Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln					
		340		345		350
	Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser					
		355		360		365
10	Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys					
		370		375		380
	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln					
	385		390		395	400
	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu					
15		405		410		415
	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg					
		420		425		430
	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met					
		435		440		445
20	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly					
		450		455		460
	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp					
	465		470		475	480
	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg					
25		485		490		
	<210> 24					
	<211> 493					
	<212> БЕЛОК					
	<213> Искусственная последовательность					
30	<220>					
	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-24					
	<400> 24					
	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu					
	1	5		10		15
35	His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu					
		20		25		30
	Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu					
		35		40		45
	Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys					
40		50		55		60
	Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu					
	65		70		75	80
	Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe					
		85		90		95
45	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Ser					
		100		105		110
	Cys Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys					
		115		120		125

RU 2747457 C2

	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	
	130						135					140					
	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	
	145					150					155					160	
5	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	
					165					170						175	
	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	
					180				185						190		
	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro	
10				195				200						205			
	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	
	210						215					220					
	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	
	225					230					235					240	
15	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	
					245					250					255		
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	
				260					265						270		
	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	
20				275					280					285			
	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	
	290						295					300					
	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	
	305					310				315						320	
25	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	
					325					330					335		
	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	
				340					345					350			
	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	
30				355				360					365				
	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	
	370					375					380						
	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	
	385					390				395						400	
35	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	
					405					410					415		
	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	
				420					425					430			
	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	
40				435				440					445				
	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	
	450					455					460						
	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	
	465					470					475					480	
45	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg				
					485					490							
	<210>	25															
	<211>	493															

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-30

5 <400> 25

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
20 25 30

10 Ala Met Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45

Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

15 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Ser
100 105 110

20 Cys Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140

25 Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu
145 150 155 160

Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
165 170 175

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

30 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
195 200 205

Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr
210 215 220

35 Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp
225 230 235 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr
260 265 270

40 Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
275 280 285

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
290 295 300

45 Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
305 310 315 320

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
325 330 335

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

		340		345		350											
		Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser
		355						360						365			
5		Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys
		370						375						380			
		Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln
		385					390					395				400	
		Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu
					405						410					415	
10		Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg
					420					425					430		
		Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met
					435					440					445		
15		Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly
		450						455					460				
		Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp
		465					470					475				480	
		Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg			
					485						490						
20	<210>	26															
	<211>	493															
	<212>	БЕЛЮК															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
25	<223>	Гуманизированный CAR anti-BCMA-31															
	<400>	26															
		Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
		1			5						10				15		
		His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu
30					20					25					30		
		Ala	Met	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu
					35				40					45			
		Ser	Val	Ser	Val	Ile	Gly	Ala	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
					50			55					60				
35		Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu
		65					70				75					80	
		Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
					85					90					95		
		Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ile	Tyr	Ser
40					100					105					110		
		Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
					115				120				125				
		Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
					130			135					140				
45		Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu
		145				150					155					160	
		Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
					165					170					175		

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro
 195 200 205
 5 Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr
 210 215 220
 Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp
 225 230 235 240
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 10 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr
 260 265 270
 Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
 275 280 285
 15 Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
 290 295 300
 Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
 305 310 315 320
 Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
 20 325 330 335
 Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 340 345 350
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 355 360 365
 25 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 370 375 380
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 385 390 395 400
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 30 405 410 415
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 420 425 430
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 435 440 445
 35 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 450 455 460
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
 465 470 475 480
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 40 485 490
 <210> 27
 <211> 493
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-32
 <400> 27
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

RU 2 747 457 C2

5	1	5				10				15						
	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu
	20				25				30							
	Ala	Met	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu
	35				40				45							
10	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Gly	Ala	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
	50				55				60							
	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu
	65				70				75				80			
	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
15	85				90				95							
	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ile	Tyr	Ser
	100				105				110							
	Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
	115				120				125							
20	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
	130				135				140							
	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu
	145				150				155				160			
	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
25	165				170				175							
	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
	180				185				190							
	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
	195				200				205							
30	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr
	210				215				220							
	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp
	225				230				235				240			
	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
35	245				250				255							
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr
	260				265				270							
	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln
	275				280				285							
40	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala
	290				295				300							
	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala
	305				310				315				320			
	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr
45	325				330				335							
	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln
	340				345				350							
	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser
	355				360				365							
50	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys
	370				375				380							
	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln

RU 2 747 457 C2

5	385	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu
						405					410					415	
		Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg
						420					425					430	
		Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met
10						435					440					445	
		Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly
						450					455					460	
		Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp
		465							470					475			480
15		Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg			
						485							490				
		<210>	28														
		<211>	493														
		<212>	БЕЛОК														
20		<213>	Искусственная последовательность														
		<220>															
		<223>	Гуманизированный CAR anti-BCMA-33														
		<400>	28														
		Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
25	1				5					10					15		
		His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu
					20					25					30		
		Ala	Met	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu
					35				40					45			
30		Ser	Val	Ser	Val	Ile	Gly	Ala	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
					50			55					60				
		Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu
		65					70					75					80
		Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
35					85					90					95		
		Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ile	Tyr	Ser
					100					105					110		
		Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
					115				120					125			
40		Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
					130				135				140				
		Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu
		145					150					155					160
		Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
45					165					170					175		
		Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly
					180					185							

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245 250 255
5 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr
260 265 270
Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
275 280 285
Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
10 290 295 300
Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
305 310 315 320
Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
325 330 335
15 Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
340 345 350
Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
355 360 365
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
20 370 375 380
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
385 390 395 400
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
405 410 415
25 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
420 425 430
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
435 440 445
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
30 450 455 460
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
465 470 475 480
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490
35 <210> 29
<211> 493
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
40 <223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-34
<400> 29
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
45 20 25 30
Ala Met Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys

RU 2747457 C2

	50		55		60											
	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu
	65					70					75					80
	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
5					85					90					95	
	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ile	Tyr	Ser
				100					105					110		
	Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
			115						120					125		
10	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
	130						135					140				
	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu
	145					150					155					160
	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
15					165					170					175	
	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly
				180					185					190		
	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
		195					200					205				
20	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr
	210						215					220				
	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp
	225					230					235					240
	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
25					245					250					255	
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr
			260						265					270		
	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln
		275					280					285				
30	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala
	290						295					300				
	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala
	305				310					315						320
	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr
35					325					330					335	
	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln
			340						345				350			
	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser
		355					360					365				
40	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	
	370					375					380					
	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln
	385					390				395						400
	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu
45					405					410					415	
	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg
			420						425				430			
	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met

	435	440	445	
	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly			
	450	455	460	
	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp			
5	465	470	475	480
	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485	490		
	<210> 30			
	<211> 1485			
10	<212> ДНК			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-10			
	<400> 30			
15	atggccctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga			60
	cccgacatcg tgctgacaca gagccctgcc agcctggccg tgagcctggg agaaagggcc			120
	accatcaact gcagggcctc cgaaagcgtg agcgtgatcg gcgccacct gatccactgg			180
	tatcagcaga agcccggcca gcctcccaag ctgctgatct acctggccag caacctggaa			240
	accggcgtgc ctgccaggtt tagcgggagc ggcagcggca ccgatttcac cctgaccatc			300
20	agcagcctgc aggccgagga cgctgccatc tactactgcc tgcaagtccag gatcttcccc			360
	aggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagggca gcaccagcgg cagcggcaag			420
	cccggtctccg gagagggcag caccaagggc caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcag			480
	ctgaagaaac ccggcgccag cgtgaagggt agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc			540
	gactacagca tcaactgggt gaggcaggcc cctggacagg gactggagtg gatgggctgg			600
25	atcaacaccg agaccaggga gcccgctac gcctacgact tcaggggcag gttcgtgttc			660
	agcctggaca ccagcgtgag caccgcctac ctgcagatca gcagcctgaa ggccgaggac			720
	accgccgtgt actactgcgc cagggactac agctacgcca tggactactg gggccagggc			780
	accctggtga cagtgtccag cgcggccgca accacaacac ctgctccaag gccccccaca			840
	cccgtccaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccga			900
30	gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggcc			960
	cctttggccg gaacatgtgg ggtgttgctt ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag			1020
	cgcgggagaa agaagctcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc			1080
	actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc tccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa			1140
	ctgagggtga aattttctag aagcgccgat gctcccgcat atcagcaggg tcagaatcag			1200
35	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg			1260
	ggcagggatc ccgagatggg gggaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgac			1320
	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa			1380
	agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac			1440
	acttatgatg cgttgcataat gcaagccttg ccaccccgct aatga			1485
40	<210> 31			
	<211> 1485			
	<212> ДНК			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
45	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-11			
	<400> 31			
	atggccctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga			60
	cccgacatcg tgctgacaca gagccctgcc agcctggccg tgagcctggg agaaagggcc			120

	accatcaact	gcagggcctc	cgaaagcgtg	agcgtgatcg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccggcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
	accggcgtgc	ctgccaggtt	tagcgggagc	ggcagcggca	ccgatttcac	cctgaccatc	300
	agcagcctgc	aggccgagga	cgctgccatc	tactactgcc	tgcagtccag	gatcttcccc	360
5	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggcag	caccaagggc	caggtgcagc	tgggtgcagag	cggctccgag	480
	ctgaagaagc	ccggcgagag	cgtgaaggtg	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
	gactactcca	tcaactgggt	gagacaggcc	cctggccagg	gactggagtg	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	agaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
10	agcctggaca	ccagcgtgag	caccgcctac	ctgcagatca	gcagcctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	actactgcgc	cctggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
	acactggtga	ccgtgagcag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
15	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080
	actcaggaag	aagatgggtg	ttcatgccgc	ttccccgagg	aggaagaagg	aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga	aattttctag	aagcgccgat	gctcccgcac	atcagcaggg	tcagaatcag	1200
	ctctacaatg	aattgaatct	cgcgaggcga	gaagagtacg	atgttctgga	caagagacgg	1260
20	ggcaggggatc	ccgagatggg	gggaaagccc	cggagaaaaa	atcctcagga	gggggtgtac	1320
	aatgagctgc	agaaggacaa	gatggctgaa	gcctatagcg	agatcggaat	gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag	gcaaggggca	tgacgggtctg	taccagggtc	tctctacagc	caccaaggac	1440
	acttatgatg	cgttgcatac	gcaagccttg	ccaccccgct	aatga		1485
	<210>	32					
25	<211>	1485					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Гуманизированный CAR anti-BCMA-12					
30	<400>	32					
	atggccctgc	ctgtgaccgc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgccaga	60
	cccgacatcg	tgctgacaca	gagccctgcc	agcctggccg	tgagcctggg	agaaagggcc	120
	accatcaact	gcagggcctc	cgaaagcgtg	agcgtgatcg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccggcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
35	accggcgtgc	ctgccaggtt	tagcgggagc	ggcagcggca	ccgatttcac	cctgaccatc	300
	agcagcctgc	aggccgagga	cgctgccatc	tactactgcc	tgcagtccag	gatcttcccc	360
	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggctc	caccaagggc	caggtgcagc	tgggtgcagag	cggcagcgag	480
	ctgaagaagc	ccggcgagtc	cgtgaagatc	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
40	gactacagca	tcaactgggt	gagacaggcc	cctggacagg	gcctggagtg	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	aaaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
	tccctggaca	cctccgccag	caccgcctac	ctgcagatca	gctccctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	acttctgcgc	cctggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccagggg	780
	accctggtga	ccgtgagcag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
45	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080

	actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc tttcccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga aatttttctag aagcgccgat gctcccgcat atcagcaggg tcagaatcag	1200
	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg	1260
	ggcaggggatc ccgagatggg gggaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgtac	1320
5	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
	acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgct aatga	1485
	<210> 33	
	<211> 1485	
10	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-13	
	<400> 33	
15	atggccctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga	60
	cccgcacatcg tgctgacaca gagccctgcc agcctggccg tgagcctggg agaaagggcc	120
	accatcaact gcagggcctc cgaaagcgtg agcgtgatcg gcgccacct gatccactgg	180
	tatcagcaga agcccggcca gcctcccaag ctgctgatct acctggccag caacctggaa	240
	accggcgtgc ctgccagggt tagcggggagc ggcagcggca ccgatttcac cctgaccatc	300
20	agcagcctgc agggccgagga cgctgccatc tactactgcc tgagcctggg gatcttcccc	360
	aggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagggca gcaccagcgg cagcggcaag	420
	cccggctccg gagagggctc caccaagggc caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcag	480
	ctgaagaagc ccggcgagtc cgtgaagatc agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc	540
	gactacagca tcaactgggt gaagcaggcc cctggacagg gcctgaagtg gatgggctgg	600
25	atcaacaccg aaaccaggga gcccgctac gcctacgact tcaggggcag gttcgtgttc	660
	tccctggaca cctccgccag caccgcctac ctgcagatca gctccctgaa ggccgaggac	720
	accgccgtgt acttctgcgc cctggactac agctacgcca tggactactg gggccaggga	780
	acctgtgtga ccgtgagcag cgcggccgca accacaacac ctgctccaag gccccccaca	840
	cccgtccaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccgcga	900
30	gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggcc	960
	cctttggccg gaacatgtgg ggtgttgctt ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa agaagctcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc	1080
	actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc tttcccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga aatttttctag aagcgccgat gctcccgcat atcagcaggg tcagaatcag	1200
35	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg	1260
	ggcaggggatc ccgagatggg gggaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgtac	1320
	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
	acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgct aatga	1485
40	<210> 34	
	<211> 1485	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
45	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-14	
	<400> 34	
	atggccctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga	60
	cccgcacatcg tgctgacaca gagccctgcc agcctggccg tgagcctggg agaaagggcc	120

	accatcaact	gcagggcctc	cgaaagcgtg	agcgtgatcg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccggcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
	accggcgtgc	ctgccaggtt	tagcgggagc	ggcagcggca	ccgatttcac	cctgaccatc	300
	agcagcctgc	aggccgagga	cgctgccatc	tactactgcc	tgcagtccag	gatcttcccc	360
5	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggctc	caccaagggc	cagatccagc	tgggtgcagag	cggcagcgag	480
	ctgaagaagc	ccggcgagtc	cgtgaagatc	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
	gactacagca	tcaactgggt	gaagcaggcc	cctggacagg	gcctgaagtg	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	aaaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
10	tccttgga	cctccgccag	caccgcctac	ctgcagatca	gctccctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	acttctgcgc	cctggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccaggga	780
	accctggtga	ccgtgagcag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
15	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080
	actcaggaag	aagatgggtg	ttcatgccgc	ttccccgagg	aggaagaagg	aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga	aattttctag	aagcgccgat	gctcccgcac	atcagcaggg	tcagaatcag	1200
	ctctacaatg	aattgaatct	cggcaggcga	gaagagtacg	atgttctgga	caagagacgg	1260
20	ggcagggatc	ccgagatggg	gggaaagccc	cggagaaaaa	atcctcagga	gggggtgtac	1320
	aatgagctgc	agaaggacaa	gatggctgaa	gcctatagcg	agatcggaat	gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag	gcaaggggca	tgacgggtctg	taccagggtc	tctctacagc	caccaaggac	1440
	acttatgatg	cgttgcatat	gcaagccttg	ccaccccgct	aatga		1485
	<210>	35					
25	<211>	1485					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Гуманизированный CAR anti-BCMA-20					
30	<400>	35					
	atggccctgc	ctgtgaccgc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgccaga	60
	cccgacatcg	tgctgacaca	gagccctgcc	agcctggccg	tgagcctggg	agaaagggcc	120
	accatcaact	gcagggcctc	cgaaagcgtg	agcgtgatcg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccggcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
35	accggcgtgc	ctgccaggtt	tagcgggagc	ggcagcggca	ccgatttcac	cctgaccatc	300
	agcagcctgc	aggccgagga	cgctgccatc	tacagctgcc	tgcagtccag	gatcttcccc	360
	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggcag	caccaagggc	caggtgcagc	tgggtgcagag	cggcagcgag	480
	ctgaagaaac	ccggcgccag	cgtgaagggtg	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
40	gactacagca	tcaactgggt	gaggcaggcc	cctggacagg	gactggagtg	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	agaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
	agcctggaca	ccagcgtgag	caccgcctac	ctgcagatca	gcagcctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	actactgcgc	cagggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
	accctggtga	cagtgtccag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
45	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080

	actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga aatttttctag aagcgccgat gctccccgat atcagcaggg tcagaatcag	1200
	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg	1260
	ggcaggggatc ccgagatggg gggaaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgtac	1320
5	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
	acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgtc aatga	1485
	<210> 36	
	<211> 1485	
10	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-21	
	<400> 36	
15	atggccctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga	60
	cccgcacatcg tgctgacaca gagccctgcc agcctggccg tgagcctggg agaaagggcc	120
	accatcaact gcagggcctc cgaaaagcgtg agcgtgatcg gcgccacct gatccactgg	180
	tatcagcaga agcccggcca gcctcccaag ctgctgatct acctggccag caacctggaa	240
	accggcgtgc ctgccagggt tagcggggagc ggcagcggca ccgatttcac cctgaccatc	300
20	agcagcctgc agggccgagga cgctgccatc tacagctgcc tgagtcctag gatcttcccc	360
	aggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagggca gcaccagcgg cagcggcaag	420
	cccggctccg gagagggcag caccaagggc caggtgcagc tgggtgcagag cggctccgag	480
	ctgaagaagc ccggcgagag cgtgaagggt agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc	540
	gactactcca tcaactgggt gagacaggcc cctggccagg gactggagtg gatgggctgg	600
25	atcaacaccg agaccaggga gcccgctac gcctacgact tcaggggcag gttcgtgttc	660
	agcctggaca ccagcgtgag caccgcctac ctgcagatca gcagcctgaa ggccgaggac	720
	accgccgtgt actactgcgc cctggactac agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
	acactggtga ccgtgagcag cgcggccgca accacaacac ctgctccaag gccccccaca	840
	cccgcctcaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccgca	900
30	gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggcc	960
	cctttggccg gaacatgtgg ggtgttgctt ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa agaagctcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc	1080
	actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga aatttttctag aagcgccgat gctccccgat atcagcaggg tcagaatcag	1200
35	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg	1260
	ggcaggggatc ccgagatggg gggaaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgtac	1320
	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
	acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgtc aatga	1485
40	<210> 37	
	<211> 1485	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
45	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-22	
	<400> 37	
	atggccctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga	60
	cccgcacatcg tgctgacaca gagccctgcc agcctggccg tgagcctggg agaaagggcc	120

	accatcaact	gcagggcctc	cgaaagcgtg	agcgtgatcg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccgcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
	accggcgtgc	ctgccaggtt	tagcgggagc	ggcagcggca	ccgatttcac	cctgaccatc	300
	agcagcctgc	aggccgagga	cgctgccatc	tacagctgcc	tgcagtccag	gatcttcccc	360
5	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggctc	caccaagggc	caggtgcagc	tgggtgcagag	cggcagcgag	480
	ctgaagaagc	ccggcgagtc	cgtgaagatc	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
	gactacagca	tcaactgggt	gagacaggcc	cctggacagg	gcctggagtg	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	aaaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
10	tccttgga	cctccgccag	caccgcctac	ctgcagatca	gctccctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	acttctgcgc	cctggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccaggga	780
	accctggtga	ccgtgagcag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
15	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080
	actcaggaag	aagatgggtg	ttcatgccgc	ttccccgagg	aggaagaagg	aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga	aattttctag	aagcgccgat	gctcccgcac	atcagcaggg	tcagaatcag	1200
	ctctacaatg	aattgaatct	cgcgaggcga	gaagagtacg	atgttctgga	caagagacgg	1260
20	ggcaggggatc	ccgagatggg	gggaaagccc	cggagaaaaa	atcctcagga	gggggtgtac	1320
	aatgagctgc	agaaggacaa	gatggctgaa	gcctatagcg	agatcggaat	gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag	gcaaggggca	tgacgggtctg	taccagggtc	tctctacagc	caccaaggac	1440
	acttatgatg	cgttgcatat	gcaagccttg	ccaccccgct	aatga		1485
	<210>	38					
25	<211>	1485					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Гуманизированный CAR anti-BCMA-23					
30	<400>	38					
	atggccctgc	ctgtgaccgc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgccaga	60
	cccgacatcg	tgctgacaca	gagccctgcc	agcctggccg	tgagcctggg	agaaagggcc	120
	accatcaact	gcagggcctc	cgaaagcgtg	agcgtgatcg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccgcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
35	accggcgtgc	ctgccaggtt	tagcgggagc	ggcagcggca	ccgatttcac	cctgaccatc	300
	agcagcctgc	aggccgagga	cgctgccatc	tacagctgcc	tgcagtccag	gatcttcccc	360
	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggctc	caccaagggc	caggtgcagc	tgggtgcagag	cggcagcgag	480
	ctgaagaagc	ccggcgagtc	cgtgaagatc	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
40	gactacagca	tcaactgggt	gaagcaggcc	cctggacagg	gcctgaagtg	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	aaaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
	tccttgga	cctccgccag	caccgcctac	ctgcagatca	gctccctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	acttctgcgc	cctggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccaggga	780
	accctggtga	ccgtgagcag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
45	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080

	actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga aatttttctag aagcgccgat gctccccgat atcagcaggg tcagaatcag	1200
	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg	1260
	ggcaggggatc ccgagatggg gggaaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgtac	1320
5	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
	acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgtc aatga	1485
	<210> 39	
	<211> 1485	
10	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-24	
	<400> 39	
15	atggccctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga	60
	cccgcacatcg tgctgacaca gagccctgcc agcctggccg tgagcctggg agaaagggcc	120
	accatcaact gcagggcctc cgaaaagcgtg agcgtgatcg gcgccacct gatccactgg	180
	tatcagcaga agcccggcca gcctcccaag ctgctgatct acctggccag caacctggaa	240
	accggcgtgc ctgccagggt tagcggggagc ggcagcggca ccgatttcac cctgaccatc	300
20	agcagcctgc agggccgagga cgctgccatc tacagctgcc tgagtcctag gatcttcccc	360
	aggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagggca gcaccagcgg cagcggcaag	420
	cccggctccg gagagggctc caccaagggc cagatccagc tgggtgcagag cggcagcag	480
	ctgaagaagc ccggcgagtc cgtgaagatc agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc	540
	gactacagca tcaactgggt gaagcaggcc cctggacagg gcctgaagtg gatgggctgg	600
25	atcaacaccg aaaccaggga gcccgctac gcctacgact tcaggggcag gttcgtgttc	660
	tccctggaca cctccgccag caccgcctac ctgcagatca gctccctgaa ggccgaggac	720
	accgccgtgt acttctgcgc cctggactac agctacgcca tggactactg gggccaggga	780
	accctggtga ccgtgagcag cgcggccgca accacaacac ctgctccaag gccccccaca	840
	cccgtccaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccgca	900
30	gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggcc	960
	cctttggccg gaacatgtgg ggtgttgctt ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa agaagctcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc	1080
	actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga aatttttctag aagcgccgat gctccccgat atcagcaggg tcagaatcag	1200
35	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg	1260
	ggcaggggatc ccgagatggg gggaaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgtac	1320
	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
	acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgtc aatga	1485
40	<210> 40	
	<211> 1485	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
45	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-30	
	<400> 40	
	atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccagg	60
	cctgacatcg tgctgaccga gtcccctgct agcctggcca tgagcctggg cgagagagcc	120

	accatcagct	gcagggccag	cgagagcgtg	agcgtgattg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccggcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
	accggcgtgc	ccgccagatt	tagcgggagc	ggctccggca	ccgacttcac	actgaccatc	300
	agcaggggtgc	aggctgagga	cgccgccatc	tacagctgcc	tgagagcag	aatcttcccc	360
5	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggcag	caccaagggc	caggtgcagc	tgggtgcagag	cggcagcag	480
	ctgaagaaac	ccggcgccag	cgtgaagggtg	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
	gactacagca	tcaactgggt	gaggcaggcc	cctggacagg	gactggagt	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	agaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
10	agcctggaca	ccagcgtgag	caccgcctac	ctgcagatca	gcagcctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	actactgcgc	cagggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
	accctggtga	cagtgtccag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
15	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080
	actcaggaag	aagatgggtg	ttcatgccgc	ttccccgagg	aggaagaagg	aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga	aattttctag	aagcgccgat	gctcccgcac	atcagcaggg	tcagaatcag	1200
	ctctacaatg	aattgaatct	cgccagggcg	gaagagtacg	atgttctgga	caagagacgg	1260
20	ggcaggggatc	ccgagatggg	gggaaagccc	cggagaaaaa	atcctcagga	gggggtgtac	1320
	aatgagctgc	agaaggacaa	gatggctgaa	gcctatagcg	agatcggaat	gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag	gcaaggggca	tgacgggtctg	taccagggtc	tctctacagc	caccaaggac	1440
	acttatgatg	cgttgcatac	gcaagccttg	ccaccccgct	aatga		1485
	<210>	41					
25	<211>	1485					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Гуманизированный CAR anti-BCMA-31					
30	<400>	41					
	atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgccagg	60
	cctgacatcg	tgctgaccca	gtcccctgct	agcctggcca	tgagcctggg	cgagagagcc	120
	accatcagct	gcagggccag	cgagagcgtg	agcgtgattg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccggcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
35	accggcgtgc	ccgccagatt	tagcgggagc	ggctccggca	ccgacttcac	actgaccatc	300
	agcaggggtgc	aggctgagga	cgccgccatc	tacagctgcc	tgagagcag	aatcttcccc	360
	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggcag	caccaagggc	caggtgcagc	tgggtgcagag	cggctccgag	480
	ctgaagaagc	ccggcgagag	cgtgaagggtg	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
40	gactactcca	tcaactgggt	gagacaggcc	cctggccagg	gactggagt	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	agaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
	agcctggaca	ccagcgtgag	caccgcctac	ctgcagatca	gcagcctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	actactgcgc	cctggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
	acactggtga	ccgtgagcag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
45	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080

	actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga aatttttctag aagcgccgat gctccccgat atcagcaggg tcagaatcag	1200
	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg	1260
	ggcaggggatc ccgagatggg gggaaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgtac	1320
5	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
	acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgct aatga	1485
	<210> 42	
	<211> 1485	
10	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-32	
	<400> 42	
15	atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccagg	60
	cctgacatcg tgctgaccca gtcccctgct agcctggcca tgagcctggg cgagagagcc	120
	accatcagct gcagggccag cgagagcgtg agcgtgattg gcgccacct gatccactgg	180
	tatcagcaga agcccggcca gcctcccaag ctgctgatct acctggccag caacctggaa	240
	accggcgtgc ccgccagatt tagcggggagc ggctccggca ccgacttcac actgaccatc	300
20	agcaggggtgc aggtctgagga cgcgcccatc tacagctgcc tgacagagcag aatcttcccc	360
	aggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagggca gcaccagcgg cagcggcaag	420
	cccggctccg gagagggctc caccaagggc caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcag	480
	ctgaagaagc ccggcgagtc cgtgaagatc agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc	540
	gactacagca tcaactgggt gagacaggcc cctggacagg gcctggagtg gatgggctgg	600
25	atcaacaccg aaaccaggga gcccgctac gcctacgact tcaggggcag gttcgtgttc	660
	tccctggaca cctccgccag caccgcctac ctgcagatca gctccctgaa ggccgaggac	720
	accgccgtgt acttctgcgc cctggactac agctacgcca tggactactg gggccaggga	780
	accctggtga ccgtgagcag cgcggccgca accacaacac ctgctccaag gccccccaca	840
	cccgtccaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccgca	900
30	gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggcc	960
	cctttggccg gaacatgtgg ggtgttgctt ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa agaagctcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc	1080
	actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga aatttttctag aagcgccgat gctccccgat atcagcaggg tcagaatcag	1200
35	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg	1260
	ggcaggggatc ccgagatggg gggaaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgtac	1320
	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
	acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgct aatga	1485
40	<210> 43	
	<211> 1485	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
45	<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-33	
	<400> 43	
	atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccagg	60
	cctgacatcg tgctgaccca gtcccctgct agcctggcca tgagcctggg cgagagagcc	120

	accatcagct	gcagggccag	cgagagcgtg	agcgtgattg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccggcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
	accggcgtgc	ccgccagatt	tagcgggagc	ggctccggca	ccgacttcac	actgaccatc	300
	agcaggggtgc	aggctgagga	cgccgccatc	tacagctgcc	tgagagcag	aatcttcccc	360
5	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggctc	caccaagggc	caggtgcagc	tgggtgcagag	cggcagcagag	480
	ctgaagaagc	ccggcgagtc	cgtgaagatc	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
	gactacagca	tcaactgggt	gaagcaggcc	cctggacagg	gcctgaagtg	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	aaaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
10	tccttgga	cctccgccag	caccgcctac	ctgcagatca	gctccctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	acttctgcgc	cctggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccaggga	780
	accctggtga	ccgtgagcag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
15	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080
	actcaggaag	aagatgggtg	ttcatgccgc	ttccccgagg	aggaagaagg	aggggtgtgaa	1140
	ctgaggggtga	aattttctag	aagcgccgat	gctcccgcac	atcagcaggg	tcagaatcag	1200
	ctctacaatg	aattgaatct	cgccagggca	gaagagtacg	atgttctgga	caagagacgg	1260
20	ggcaggggatc	ccgagatggg	gggaaagccc	cggagaaaaa	atcctcagga	gggggtgtac	1320
	aatgagctgc	agaaggacaa	gatggctgaa	gcctatagcg	agatcggaat	gaaaggcgaa	1380
	agacgcagag	gcaaggggca	tgacgggtctg	taccagggtc	tctctacagc	caccaaggac	1440
	acttatgatg	cgttgcatat	gcaagccttg	ccaccccgct	aatga		1485
	<210>	44					
25	<211>	1485					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Гуманизированный CAR anti-BCMA-34					
30	<400>	44					
	atggccctgc	ctgtgacagc	cctgctgctg	cctctggctc	tgctgctgca	tgccgccagg	60
	cctgacatcg	tgctgaccca	gtcccctgct	agcctggcca	tgagcctggg	cgagagagcc	120
	accatcagct	gcagggccag	cgagagcgtg	agcgtgattg	gcgcccacct	gatccactgg	180
	tatcagcaga	agcccggcca	gcctcccaag	ctgctgatct	acctggccag	caacctggaa	240
35	accggcgtgc	ccgccagatt	tagcgggagc	ggctccggca	ccgacttcac	actgaccatc	300
	agcaggggtgc	aggctgagga	cgccgccatc	tacagctgcc	tgagagcag	aatcttcccc	360
	aggaccttcg	gccagggcac	caagctggag	atcaagggca	gcaccagcgg	cagcggcaag	420
	cccggctccg	gagagggctc	caccaagggc	cagatccagc	tgggtgcagag	cggcagcagag	480
	ctgaagaagc	ccggcgagtc	cgtgaagatc	agctgcaagg	ccagcggcta	caccttcacc	540
40	gactacagca	tcaactgggt	gaagcaggcc	cctggacagg	gcctgaagtg	gatgggctgg	600
	atcaacaccg	aaaccaggga	gcccgcctac	gcctacgact	tcaggggcag	gttcgtgttc	660
	tccttgga	cctccgccag	caccgcctac	ctgcagatca	gctccctgaa	ggccgaggac	720
	accgccgtgt	acttctgcgc	cctggactac	agctacgcca	tggactactg	gggccaggga	780
	accctggtga	ccgtgagcag	cgcggccgca	accacaacac	ctgctccaag	gccccccaca	840
45	cccgtccaa	ctatagccag	ccaaccattg	agcctcagac	ctgaagcttg	caggcccgcga	900
	gcaggaggcg	ccgtccatac	gcgaggcctg	gacttcgcgt	gtgatattta	tatttgggcc	960
	cctttggccg	gaacatgtgg	ggtgttgctt	ctctcccttg	tgatcactct	gtattgtaag	1020
	cgcgggagaa	agaagctcct	gtacatcttc	aagcagcctt	ttatgcgacc	tgtgcaaacc	1080

actcaggaag aagatgggtg ttcattgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa 1140
ctgaggggtga aatttttctag aagcgccgat gctcccgcat atcagcaggg tcagaatcag 1200
ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg 1260
ggcaggggatc ccgagatggg gggaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgtac 1320
5 aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa 1380
agacgcagag gcaaggggca tgacgggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac 1440
acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgct aatga 1485
<210> 45
<211> 184
10 <212> БЕЛЮК
<213> Homo sapiens
<400> 45
Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15
15 Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30
Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45
Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
20 50 55 60
Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
65 70 75 80
Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
85 90 95
25 Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
100 105 110
Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
115 120 125
Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
30 130 135 140
Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145 150 155 160
Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
165 170 175
35 Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
180
<210> 46
<211> 5
<212> БЕЛЮК
40 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Линкерная последовательность
<400> 46
Asp Gly Gly Gly Ser
45 1 5
<210> 47
<211> 5
<212> БЕЛЮК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Линкерная последовательность
 <400> 47
 5 Thr Gly Glu Lys Pro
 1 5
 <210> 48
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Линкерная последовательность
 <400> 48
 Gly Gly Arg Arg
 15 1
 <210> 49
 <211> 25
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <223> Линкерная последовательность
 <220>
 <221> ИНОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (1)..(25)
 25 <223> Аминокислоты в положениях 1 - 5 могут повторяться до 5 раз
 <400> 49
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 30 20 25
 <210> 50
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> Линкерная последовательность
 <400> 50
 Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
 1 5 10
 40 <210> 51
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Линкерная последовательность
 <400> 51
 Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
 1 5 10 15

Leu Asp
 <210> 52
 <211> 8
 <212> БЕЛОК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Линкерная последовательность
 <400> 52
 Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
 10 1 5
 <210> 53
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Линкерная последовательность
 <400> 53
 Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
 1 5
 20 <210> 54
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> Линкерная последовательность
 <400> 54
 Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
 1 5 10
 30 <210> 55
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Линкерная последовательность
 35 <400> 55
 Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
 1 5 10 15
 <210> 56
 <211> 18
 40 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Линкерная последовательность
 <400> 56
 45 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Lys Gly
 <210> 57

<211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <220>
 <221> ИНОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (2) .. (3)
 <223> Хаа может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту
 10 <220>
 <221> ИНОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (5) .. (5)
 <223> Хаа может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту
 <220>
 15 <221> ИНОЙ_ПРИЗНАК
 <222> (7) .. (7)
 <223> Хаа может представлять собой Gly или Ser
 <400> 57
 Glu Хаа Хаа Tyr Хаа Gln Хаа
 20 1 5
 <210> 58
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 58
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 1 5
 30 <210> 59
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 59
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
 1 5
 <210> 60
 40 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт расщепления для протеазы
 45 <400> 60
 Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
 1 5 10 15
 Pro Gly Pro

<210> 61
 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 61
 Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
 1 5 10 15
 10 Pro Gly Pro
 <210> 62
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 62
 Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 1 5 10
 20 <210> 63
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 63
 Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
 1 5 10 15
 Pro
 30 <210> 64
 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 64
 Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
 1 5 10 15
 Asn Pro Gly Pro
 40 20
 <210> 65
 <211> 24
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 65
 Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

1 5 10 15
 Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20
 <210> 66
 5 <211> 40
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт расщепления для протеазы
 10 <400> 66
 Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro
 1 5 10 15
 Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys
 20 25 30
 15 Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr
 35 40
 <210> 67
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 67
 Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
 25 1 5 10 15
 Gly Pro
 <210> 68
 <211> 40
 <212> БЕЛОК
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 68
 Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val
 35 1 5 10 15
 Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
 20 25 30
 Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 35 40
 40 <210> 69
 <211> 33
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> Сайт расщепления для протеазы
 <400> 69
 Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu
 1 5 10 15

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
 20 25 30

Pro

<210> 70

5 <211> 1467

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-10.2

10 <400> 70

atggccctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga 60
 cccgacatcg tgctgacaca gagccctgcc agcctggccg tgagcctggg agaaagggcc 120
 accatcaact gcagggcctc cgaaagcgctg agcgtgatcg gcgccacct gatccactgg 180
 tatcagcaga agcccggcca gcctcccaag ctgctgatct acctggccag caacctggaa 240
 15 accggcgctgc ctgccagggt tagcgggagc ggcagcggca ccgatttcac cctgaccatc 300
 agcagcctgc aggccgagga cgctgccatc tactactgcc tgcagtccag gatcttcccc 360
 aggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagggca gcaccagcgg cagcggcaag 420
 cccggctccg gagagggcag caccaagggc caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcag 480
 ctgaagaaac ccggcgccag cgtgaagggt agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc 540
 20 gactacagca tcaactgggt gaggcaggcc cctggacagg gactggagtg gatgggctgg 600
 atcaacaccg agaccaggga gcccgctac gcctacgact tcaggggcag gttcgtgttc 660
 agcctggaca ccagcgtgag caccgcctac ctgcagatca gcagcctgaa ggccgaggac 720
 accgccgtgt actactgcgc cagggactac agctacgcca tggactactg gggccagggc 780
 accctggtga cagtgtccag cgcggccgca gacaccggcc tctatatctg caaggtggaa 840
 25 ctgatgtatc cccacccta ttacctgggc attggaaatg gaacacagat atatgtgatt 900
 gacctgaac cttgtcctga ctctgacttc ctgttgtgga tactcgtgc agtctccagc 960
 ggtctcttct tctactcctt cctgctgact gccgtctcta aacgcggccg aaagaagctt 1020
 ctgtacatct tcaagcagcc ttttatgcga cctgtgcaaa ccactcagga agaagatggg 1080
 tgttcatgcc gcttccccga ggaggaagaa ggaggggtgt aactgagggt gaaattttct 1140
 30 agaagcgccg atgctccgcg atatcagcag ggtcagaatc agctctacaa tgaattgaat 1200
 ctcggcaggc gagaagagta cgatgttctg gacaagagac ggggcaggga tcccagatg 1260
 gggggaaaag cccggagaaa aaatcctcag gaggggttgt ataatgagct gcagaaggac 1320
 aagatggctg aagcctatag cgagatcgga atgaaaggcg aaagacgag aggcaagggg 1380
 catgacggtc tgtaccaggg tctctctaca gccaccaagg acacttatga tgcgttgcat 1440
 35 atgcaagcct tgccaccccg ctaatga 1467

<210> 71

<211> 487

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-10.2

<400> 71

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 45 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
 20 25 30
 Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu
 35 40 45

RU 2747457 C2

	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Gly	Ala	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
	50					55						60				
	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu
	65					70					75					80
5	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
					85					90					95	
	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ile	Tyr	Tyr
				100					105					110		
	Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
10			115					120					125			
	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
	130						135					140				
	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu
	145				150						155					160
15	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
					165					170					175	
	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
				180					185					190		
	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
20			195					200					205			
	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr
	210					215						220				
	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp
	225					230					235					240
25	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
					245					250					255	
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Asp	Thr
			260					265					270			
	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr
30			275					280					285			
	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro
	290					295						300				
	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Phe	Leu	Leu	Trp	Ile	Leu	Ala	Ala	Val	Ser	Ser
	305				310					315						320
35	Gly	Leu	Phe	Phe	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Lys	Arg	Gly
				325						330					335	
	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val
			340					345					350			
	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu
40			355					360					365			
	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp
	370					375					380					
	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn
	385				390						395					400
45	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg
				405						410					415	
	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly
			420						425					430		

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
435 440 445
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
450 455 460
5 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
465 470 475 480
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485
<210> 72
10 <211> 1461
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-10.5
15 <400> 72
atggccctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgccaga 60
cccgacatcg tgctgacaca gagccctgcc agcctggccg tgagcctggg agaaagggcc 120
accatcaact gcagggcctc cgaaagcgtg agcgtgatcg gcgccacct gatccactgg 180
tatcagcaga agcccggccg gcctcccaag ctgctgatct acctggccag caacctggaa 240
20 accggcgctgc ctgccagggt tagcgggagc ggcagcggca ccgatttcac cctgaccatc 300
agcagcctgc aggccgagga cgctgccatc tactactgcc tgcagtccag gatcttcccc 360
aggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagggca gcaccagcgg cagcggcaag 420
cccggtctccg gagagggcag caccaagggc caggtgcagc tggtgacagag cggcagcagag 480
ctgaagaaac ccggcgccag cgtgaagggt agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc 540
25 gactacagca tcaactgggt gaggcaggcc cctggacagg gactggagtg gatgggctgg 600
atcaacaccg agaccaggga gcccgccctac gcctacgact tcaggggcag gttcgtgttc 660
agcctggaca ccagcgtgag caccgcctac ctgcagatca gcagcctgaa ggccgaggac 720
accgccgtgt actactgcgc cagggactac agctacgccca tggactactg gggccagggc 780
accctggtga cagtgtccag cgcggccgca caaataaagg agtctctccg ggccgaattg 840
30 cgggtcactg agagaagagc tgaagtccct actgccacc ccagtccttc tccccggcca 900
gccggccaat tccagaccct ggttgttggc gttgtgggtg gcctcctggg cagtctggtt 960
ttgctggtat gggtcctggc cgtgatctgc tccaagcgcg ggagaaagaa acttctgtac 1020
atcttcaagc agcctttttat gcgacctgtg caaaccactc aggaagaaga tgggtgttca 1080
tgccgcttcc ccgaggagga agaaggaggg tgtgaactga gggtgaaatt ttctagaagc 1140
35 gccgatgctc ccgcatatca gcagggtcag aatcagctct acaatgaatt gaatctcggc 1200
aggcgagaag agtacgatgt tctggacaag agacggggca gggatcccga gatgggggga 1260
aagccccgga gaaaaaatcc tcaggagggg ttgtataatg agctgcagaa ggacaagatg 1320
gctgaagcct atagcgagat cggaatgaaa ggcgaaagac gcagaggcaa ggggcatgac 1380
gggtctgtacc aggtctcttc tacagccacc aaggacactt atgatgcgtt gcatatgcaa 1440
40 gccttgccac cccgctaattg a 1461
<210> 73
<211> 485
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
45 <220>
<223> Гуманизированный CAR anti-BCMA-10.5
<400> 73
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

RU 2747457 C2

	1		5		10		15
	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile
			20			25	
	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg
5			35			40	
	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Gly	Ala
			50			55	
	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu
	65					70	
10	Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe
					85		
	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu
					100		
	Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Ile	Phe
15					115		
	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr
					130		
	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln
	145				150		
20	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser
					165		
	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser
					180		
	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
25					195		
	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg
					210		
	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu
	225				230		
30	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
					245		
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
					260		
	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
35					275		
	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser
					290		
	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val
	305				310		
40	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala
					325		
	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys
					340		
	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys
45					355		
	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val
					370		
	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn

	385		390		395		400									
	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro
							405								415	
	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr
5						420					425				430	
	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly
						435					440				445	
	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln
						450					455				460	
10	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln
						465					470				475	
	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg											
						485										

(57) Формула изобретения

15 1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий: гуманизированное антитело к ВСМА (антиген созреваия В-клеток) или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают один или более эпитопов полипептида человеческого ВСМА; шарнир и трансмембранный домен CTLA4 или шарнир и трансмембранный домен PD-1; один
20 или более внутриклеточных доменов передачи костимулирующего сигнала и домен передачи первичного сигнала.

2. CAR по п. 1, где гуманизированное антитело к ВСМА или антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид человеческого ВСМА:

(а) выбраны из группы, включающей: верблюжий Ig, IgNAR, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)'2-фрагменты, F(ab)'3-фрагменты, Fv, одноцепочечное Fv-антитело («scFv»), бис-scFv, (scFv)2, минитело, диатело, триатело, тетратело, стабилизированный дисульфидными связями Fv-белок («dsFv») и однодоменное антитело (sdAb, нанотело);

(b) содержат один или более CDR, изложенных под любым из SEQ ID NO: 4-6;

(c) содержат один или более CDR, изложенных под любым из SEQ ID NO: 1-3;

30 (d) содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 7-9; или

(e) содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, изложенную под любым из SEQ ID NO: 10-14.

3. CAR по п. 2, где последовательность вариабельной области легкой цепи содержит последовательности CDR, изложенные под SEQ ID NO: 1-3.

4. CAR по п. 2 или 3, где последовательность вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательности CDR, изложенные под SEQ ID NO: 4-6.

5. CAR по п. 1 или 2, где один или более доменов передачи костимулирующего сигнала получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, включающей: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70.

6. CAR по любому из пп. 1-5, где один или более доменов передачи костимулирующего сигнала получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, включающей: CD28, CD134 и CD137.

7. CAR по любому из пп. 1-6, дополнительно содержащий сигнальный пептид.

8. CAR по п. 7, где сигнальный пептид предусматривает сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальный полипептид CD8α или сигнальный полипептид альфа-

субъединицы рецептора GM-CSF человека.

9. CAR по любому из пп. 1-8, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 73.

10. Полинуклеотид, кодирующий CAR по любому из пп. 1-9.

5 11. Полинуклеотид, кодирующий CAR, где полинуклеотидная последовательность изложена под SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 72.

12. Вектор для экспрессии полинуклеотида по п. 10 или 11.

13. Вектор по п. 12, где вектор представляет собой эписомный вектор, вирусный вектор, ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

10 14. Вектор по п. 13, где лентивирусный вектор выбран из группы, по существу состоящей из: вируса иммунодефицита человека 1 (HIV-1); вируса иммунодефицита человека 2 (HIV-2); вируса висна-маэди (VMV); вируса артрита-энцефалита коз (CAEV); вируса инфекционной анемии лошадей (EIAV); вируса иммунодефицита кошек (FIV); вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV).

15. Вектор по п. 13, содержащий левый (5') ретровирусный LTR, Psi (Ψ) сигнал упаковки, центральный полипуриновый тракт/ДНК-флэп (сPPT/FLAP), ретровирусный экспортный элемент; промотор, функционально связанный с полинуклеотидом по п. 10 или 11; и правый (3') ретровирусный LTR.

20 16. Вектор по п. 15, дополнительно содержащий:

(a) гетерологичную последовательность полиаденилирования;

(b) гетерологичную последовательность полиаденилирования, выбранную из последовательности полиаденилирования бычьего гормона роста или сигнальной последовательности полиаденилирования β-глобина кролика; или

25 (c) посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE) или посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

17. Вектор по п. 15, где:

(a) промотор 5' LTR замещен гетерологичным промотором;

30 (b) промотор 5' LTR замещен гетерологичным промотором, выбранным из группы, состоящей из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV) и промотора вируса обезьян 40 (SV40);

(c) 5' LTR или 3' LTR представляют собой LTR лентивируса;

(d) 3' LTR содержит одну или более модификаций, делеций или представляет собой самоинактивирующийся (SIN) LTR.

35 18. Вектор по любому из пп. 12-17, где промотор, функционально связанный с полинуклеотидом по п. 10 или 11, выбран из группы, включающей: промотор немедленно-раннего гена цитомегаловируса (CMV), промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1-α), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор убиквитина-С (UBQ-С), промотор из энхансера цитомегаловируса/промотора куриного бета-актина (CAG),
40 промотор из энхансера полиомавируса/промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса (MC1), промотор бета-актина (β-АКТ), промотор вируса обезьян 40 (SV40) и промотор (MND) с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы, с удаленным участком отрицательного контроля, с сайтом связывания праймера, замещенным на последовательность из dl587rev.

45 19. Иммунная эффекторная клетка для экспрессии вектора по любому из пп. 12-17, где иммунная эффекторная клетка представляет собой CD4⁺ Т-хелперную клетку, CD8⁺ цитотоксическую Т-клетку или естественную клетку-киллер (NK).

20. Композиция для лечения ассоциированного с ВСМА В-клеточного

злокачественного новообразования, плазмочитарного злокачественного новообразования или аутоиммунного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, содержащая эффективное количество иммунной эффекторной клетки по п. 19 и физиологически приемлемый наполнитель.

5 21. Способ получения иммунной эффекторной клетки, содержащей CAR по любому из пп. 1-9, включающий введение в иммунную эффекторную клетку вектора по любому из пп. 10-17.

22. Способ по п. 21, дополнительно включающий стимуляцию иммунной эффекторной клетки и индукцию клетки к пролиферации посредством приведения клетки в контакт
10 с антителами, которые связывают CD3, и антителами, которые связываются с CD28, с получением тем самым популяции иммунных эффекторных клеток.

23. Способ по п. 22, где иммунную эффекторную клетку стимулируют и индуцируют к пролиферации до введения вектора.

24. Способ по п. 22, где иммунные эффекторные клетки предусматривают Т-
15 лимфоциты.

25. Способ по п. 22, где иммунные эффекторные клетки предусматривают NK-клетки.

26. Способ лечения ассоциированного с ВСМА В-клеточного злокачественного новообразования, плазмочитарного злокачественного новообразования или аутоиммунного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение
20 субъекту терапевтически эффективного количества композиции по п. 20.

27. Способ по п. 26, где субъект страдает В-клеточным злокачественным новообразованием.

28. Способ по п. 27, где В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому (ММ) или неходжкинскую лимфому (NHL).

29. Способ по п. 28, где ММ выбрана из группы, включающей: клинически
25 выраженную множественную миелому, вялотекущую множественную миелому, плазмочитарный лейкоз, несекреторную миелому, IgD-миелому, остеосклеротическую миелому, солитарную плазмочитому кости и экстрамедуллярную плазмочитому.

30. Способ по п. 28, где NHL выбрана из группы, включающей: лимфому Беркитта,
30 хронический лимфолейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (CLL/SLL), диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, лимфобластную лимфому из В-клеток-предшественников и лимфому из клеток мантийной зоны.

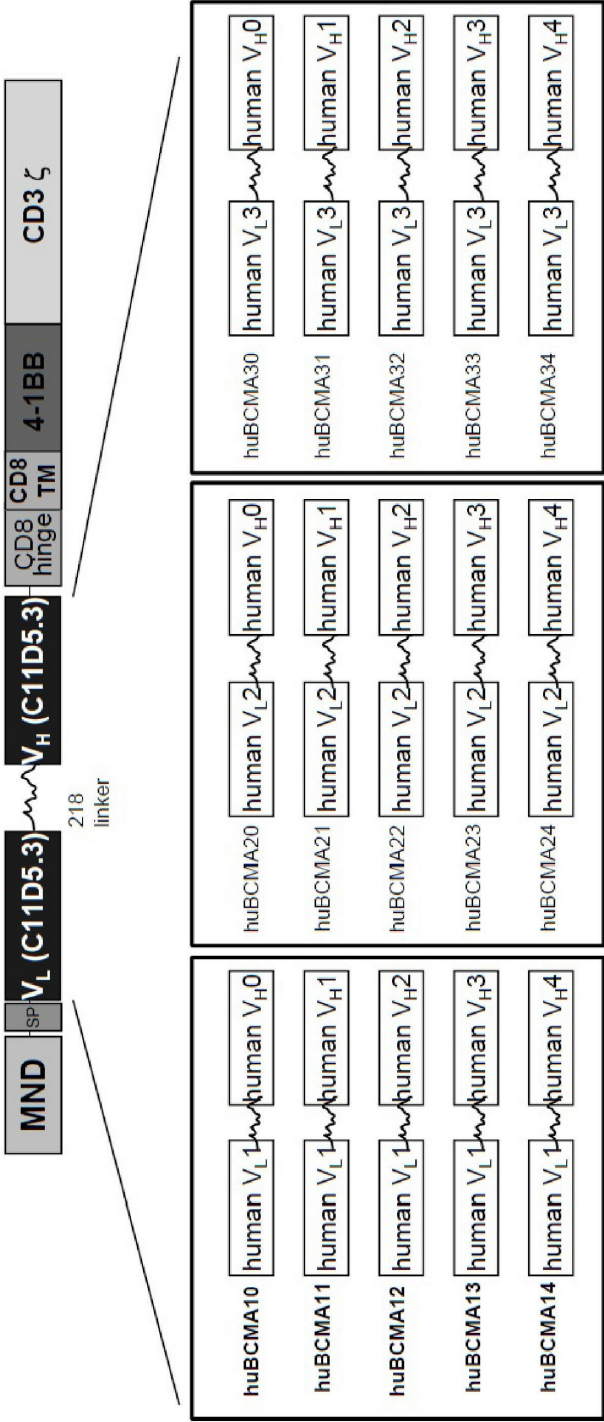
31. Способ по п. 26, где субъект страдает плазмочитарным злокачественным
35 новообразованием.

32. Способ по п. 26, где субъект страдает аутоиммунным заболеванием.

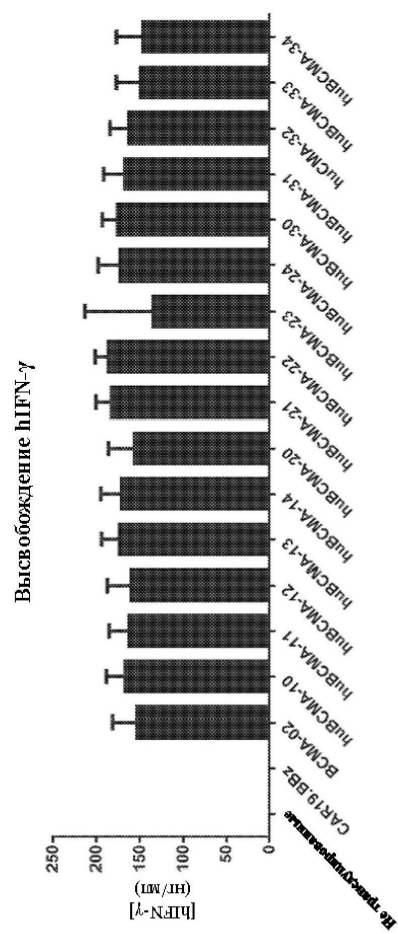
33. Способ по п. 32, где аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку.

34. Способ по п. 32, где аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный
40 артрит.

35. Способ по п. 32, где аутоиммунное заболевание представляет собой идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, или миастению гравис, или аутоиммунную гемолитическую анемию.



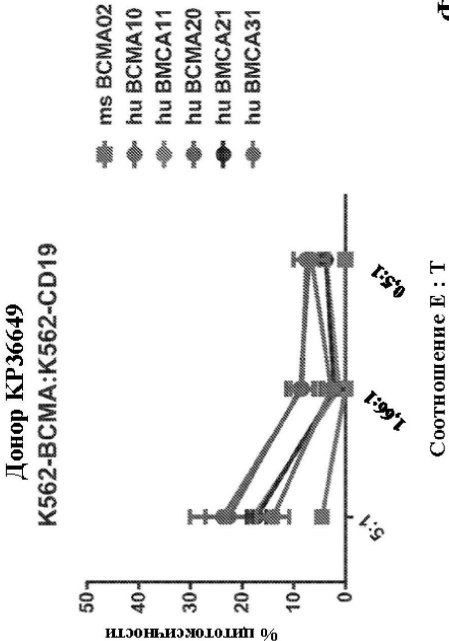
ФИГ. 1



ФИГ. 2

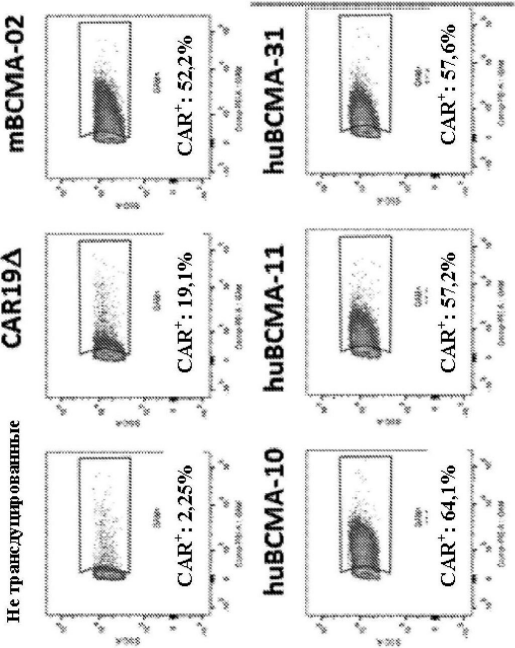
День 18

Экспрессию ВСМА установили с помощью проточной цитометрии	
ВСМА ^{метг. опухолей}	ВСМА ^{метг. опухолей}
K562-BCMA (клеточная масса)	K562-CD19



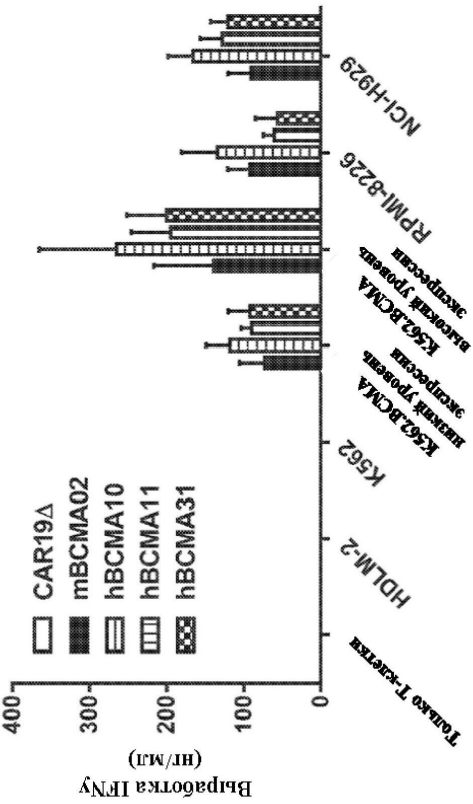
Фиг. 3

Донор 801269 (CaM+)

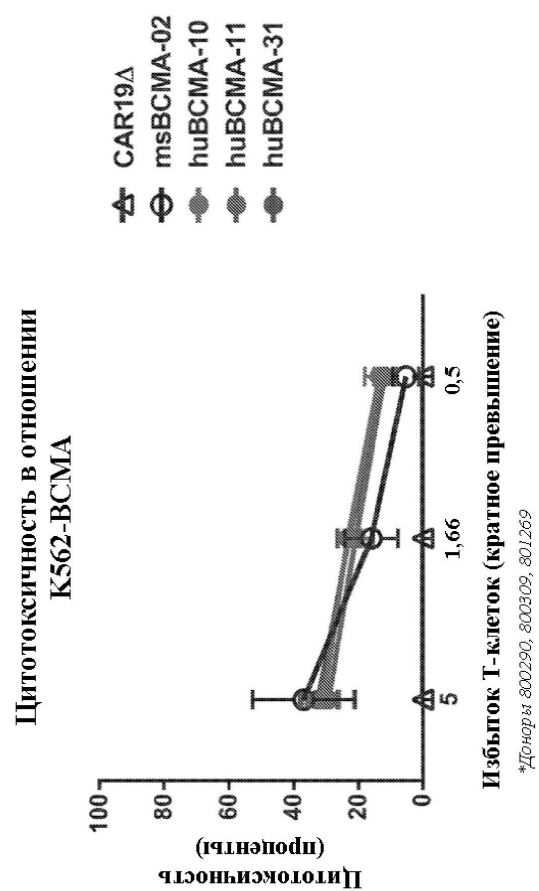


SSC-A
CAR

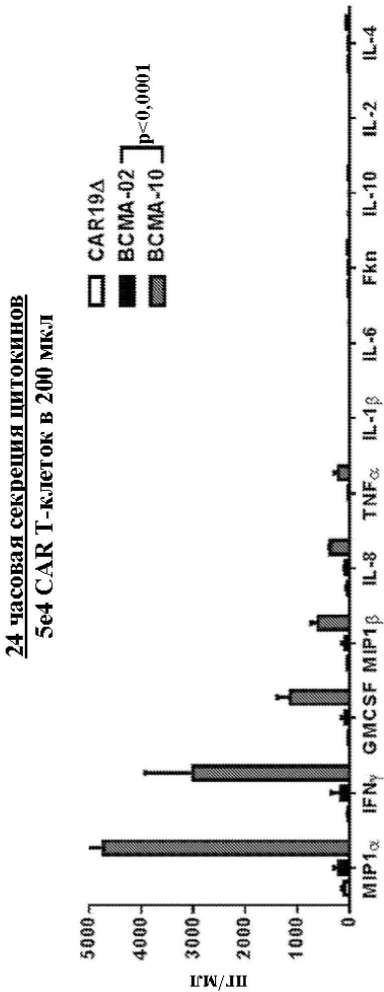
Фиг. 4



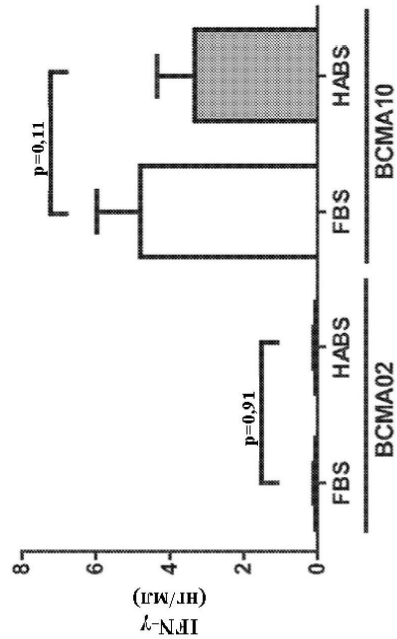
Фиг. 5



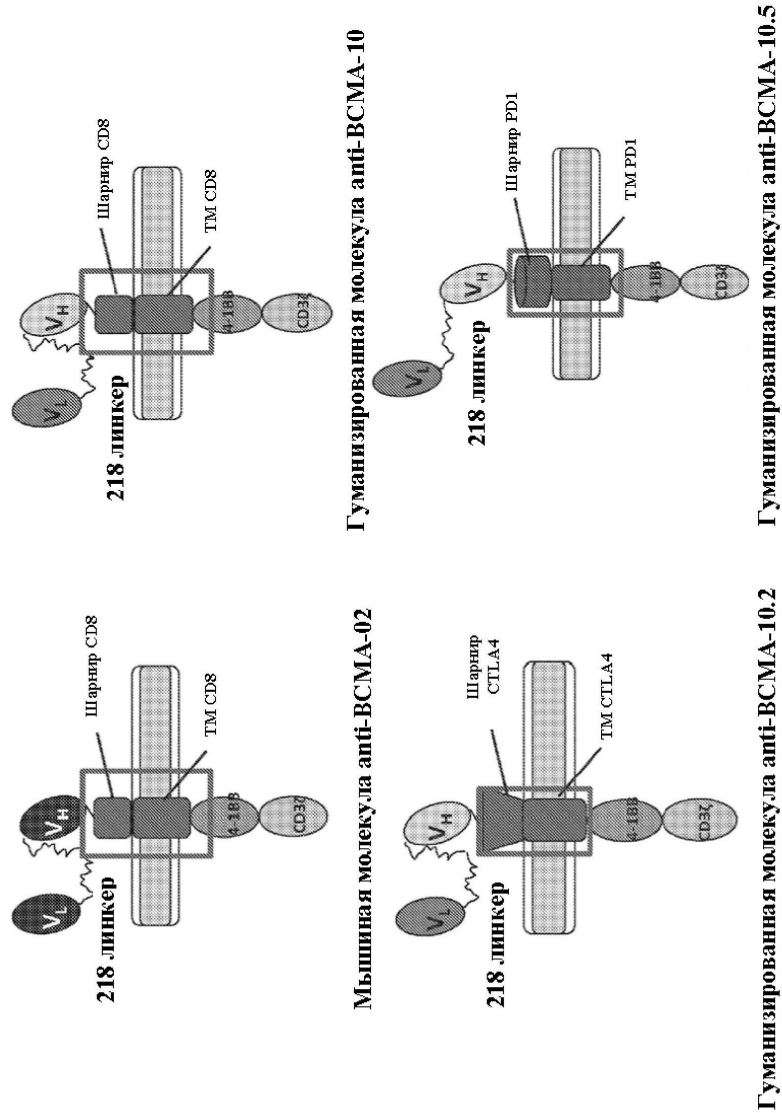
Фиг. 6



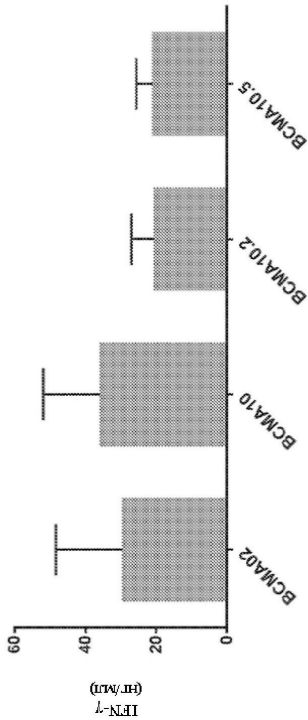
Фиг. 7



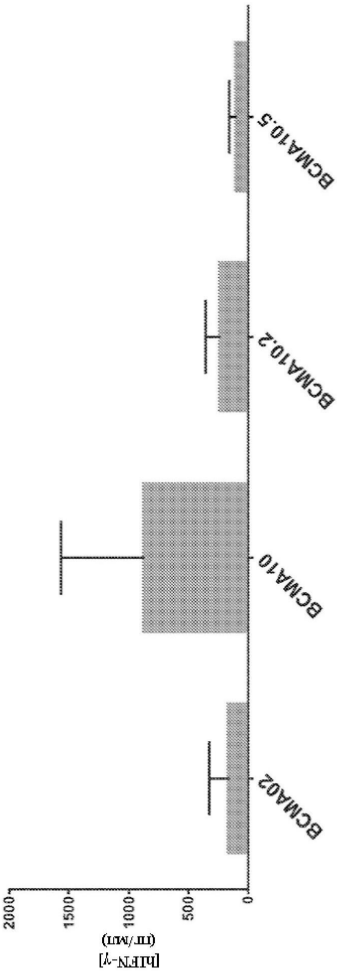
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11